

AMANDA GAILIT BALLIANA

AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (FABACEAE)
EM SUBSTRATO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Botânica, no Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Cleusa Bona

Co-orientadores:

Prof.^a Dr.^a Bárbara Baêso Moura

Prof.^o Dr.^o André Andrian Padial

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Botânica

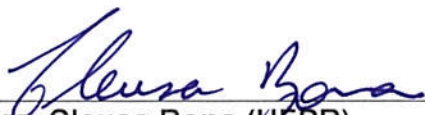


**“Avaliação morfofisiológica de *Canavalia ensiformis* (L.) DC.
(Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel”**

por

Amanda Gailit Balliana

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos doutores


Dra. Cleusa Bona (UFPR)


Dra. Edenise Segala Alves (IBT)


Dr. Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos (UFPR)

Curitiba, 28 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a Cleusa Bona por confiar no meu trabalho, pela dedicação, paciência e pelo profissionalismo que me gerou admiração.

À Dr.^a Barbara Baêso Moura pela co-orientação, por estar sempre disposta a me ajudar, por me ensinar a praticidade, a objetividade e ampliar minha visão sobre o que é fazer pesquisa.

Ao Prof. Dr. André Andrian Padial pela co-orientação e colaboração para este trabalho.

À Fundação Araucária pelo financiamento deste trabalho e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos, pelo auxílio na instalação do experimento, por providenciar todo material necessário e esclarecimento de dúvidas.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná sempre dispostos a ajudar.

Ao biólogo Nilson Belém Filho por toda ajuda na parte laboratorial, pela amizade e todas as conversas produtivas.

À doutoranda Renata Inckot pela elaboração inicial deste projeto, por empenhar tempo e esforço para conseguir financiamento e, acima de tudo, pela amizade.

Aos estagiários Gabriel, Percy e Tábata que contribuíram de alguma forma na parte experimental deste trabalho.

Agradeço a Deus por me dar a oportunidade de realizar este trabalho, por me mostrar que sou capaz e quando pensei em desistir, por me pegar pela mão e caminhar comigo.

À minha mãe, que sempre está ao meu lado me ajudando e me aplaudindo, que me ajudou manualmente e psicologicamente durante o andamento deste trabalho. Muito obrigada, eu não conseguiria sem você. Ao meu pai por todas as

palavras positivas e por trazer paz no meio de uma tempestade. Ao meu namorado Charles pela amizade, incentivo e companheirismo, me apoiando em qualquer decisão que eu tome.

À grande amiga que o mestrado me deu, Pollyana Hammerschmidt, por sempre estar disposta a me ajudar, ao incentivo e companheirismo sempre presentes, por dividir o peso e me mostrar a solução quando eu não a via. Agradeço também ao amigo Paulo, pelas conversas, risadas e cafés.

Às minhas amigas/irmãs da Comunidade Cristã de Curitiba pelo apoio espiritual.

“Esta é a maravilha e a aventura da exploração, uma parte do que vocês chamam de ciência: discernir e descobrir o que nós escondemos.” – Deus.

William P. Young, em A Cabana.

RESUMO

A contaminação ambiental por óleo diesel gera grande impacto, pois o óleo é tóxico para animais e plantas, além de ser altamente persistente no ambiente e ter degradação lenta. Por conta disso, existem pesquisas para encontrar novas técnicas alternativas de descontaminação. Dentre essas técnicas, existe a fitorremediação, que utiliza plantas e microorganismos associados na descontaminação ambiental, já que algumas espécies vegetais não tem o desenvolvimento comprometido em ambientes poluídos e auxiliam na descontaminação. Antes de serem utilizadas no processo de fitorremediação, são necessários estudos prévios para analisar a tolerância e a sobrevivência das espécies em solo contaminado. O presente estudo teve como objetivo avaliar a tolerância de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. em substrato contaminado com óleo diesel de maneiras distintas. No primeiro experimento, foram analisadas mudas da espécie em substrato contaminado com 95 ml óleo diesel kg⁻¹ por meio de análises de crescimento, teor de clorofila e carotenoides e estrutura anatômica de raízes e folhas. No segundo experimento, os mesmos parâmetros foram testados, além de análise de germinação, em substrato contaminado com diferentes concentrações de óleo diesel (11,8 ml diesel kg⁻¹; 23,7 ml diesel kg⁻¹ e 47,5 ml diesel kg⁻¹). Os resultados encontrados no primeiro experimento mostraram que as plantas em substrato contaminado apresentaram sistema radicular afetado e baixos valores de crescimento e teores de clorofila e carotenoides. Porém, as plantas que sobreviveram neste substrato emitiram novas raízes modificadas anatomicamente, com formação de aerênquima e meristema apical com alta taxa de mitose, além de ausência de danos celulares nos órgãos (raiz e folha) formados após o plantio. Para o segundo experimento, as médias referentes ao número de sementes germinadas, índice de velocidade de germinação (IVG) e valores de crescimento não diferiram estatisticamente entre os tratamentos em substrato contaminado com diferentes níveis de contaminação. Já o comprimento da raiz principal, área do metafilo e comprimento do caule aos 60 e 90 dias após a semeadura apresentaram menores médias quando comparados às plantas do tratamento em substrato não contaminado. Não houve alterações celulares nos órgãos e a planta respondeu ao estresse com o início de formação de aerênquima na raiz. Aos 210 dias após a semeadura, as plantas de todos os tratamentos apresentaram nódulos radiculares e completaram o ciclo com formação de flores e frutos e, até esses níveis, *C. ensiformis* apresentou potencial para ser utilizada como fitorremediadora.

Palavras chave: Anatomia vegetal, Leguminosa, Feijão-de-Porco, Hidrocarboneto do petróleo.

ABSTRACT

Environmental contamination by diesel oil generates impact because it is toxic to animals and plants. The diesel oil is highly persistent in the environment and have slow degradation. Because of this, there is research to find new alternative techniques for decontamination. Phytoremediation is a technique that uses plants in environmental decontamination, because there are plant species able to reduce them the environment without having compromised development. Before the plants to be useful to this technique, it needs to be tested for tolerance and survival analysis in contaminated soil. The aim of the study was to evaluate the tolerance of *Canavalia ensiformis* in contaminated substrate with diesel oil in different ways. The first experimente analyzed seedlings in contaminated soil with 95 ml kg⁻¹ of diesel oil through of growth parameters, chlorophyll and carotenoids levels and morphological structure of roots and leaves. The second section tested the same parameters, and germination analysis too, in contaminated substrate with different concentrations of diesel (11,8 ml diesel kg⁻¹; 23,7 ml diesel kg⁻¹ e 47,5 ml diesel kg⁻¹). In the first section, in contaminated substrate, the roots of the plants were affected and the plants had low growth values and chlorophyll and carotenoids levels. Despite this, the plants were tolerant to contamination by diesel oil because of the growth of anatomically adapted new roots (aerenchyma and high mitotic rate) and no cellular damage in the root and leaf formed after planting. For the second section, the mean values of number of germinated seeds, IVG and growth values did not differ between treatments in contaminated substrate. The main root length, metaphyll área and stem length at 60 and 90 days after sowing had lower mean values. There were no cellular damage in the organ formed and the plants respond to stress through aerenchyma formation. At 210 days after sowing, the plants of all treatments showed root nodules and had flowers and fruits. *Canavalia ensiformis* (L.) DC. did not drastically affected in substrate contaminated with diesel oil in concentrations of up to 47.5 ml diesel kg⁻¹. Up to this level of contamination, *C. ensiformis* has the potential to be used as phytoremediation.

Key words: Plant anatomy, jack bean, petroleum hydrocarbon.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - Avaliação morfofisiológica de mudas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel.....	21
Figura 1. Raiz e folhas de <i>Canavalia ensiformis</i> em substrato não contaminado e substrato contaminado com óleo diesel após 30 dias.....	45
Figura 2. Avaliação de crescimento de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias de plantio em substrato não contaminado (e contaminado com óleo diesel.....	47
Figura 3. Comprimento do caule de <i>Canavalia ensiformis</i> durante 30 dias de experimento em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel.....	48
Figura 4. Tricomas radiculares e secções longitudinais do ápice da raiz de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias do plantio.....	49
Figura 5. Secção transversal do ápice e base de raiz de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias do plantio em substrato não contaminado e substrato contaminado com óleo diesel.....	50
Figura 6. Teste com floroglucinol na região apical da raiz de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias do plantio.....	51
Figura 7. Superfície foliar do metafilo e secções transversais do eofilo e metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias de experimento em substrato não contaminado e em substrato contaminado com óleo diesel.....	52
Figura 8. Secções transversal e frontal do eofilo e metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 dias de experimento em substrato contaminado com óleo diesel, indicando os compostos fenólicos marcados pelo teste com cloreto férrico e azul de toluidina.....	53
CAPÍTULO II - Avaliação da germinação e desenvolvimento de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel.....	54
Figura 1. Número de sementes germinadas em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	81
Figura 2. <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 e 60 dias da semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	82

Figura 3. <i>Canavalia ensiformis</i> após 90 e 210 dias da semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	83
Figura 4. Sintomas em <i>Canavalia ensiformis</i> em substrato contaminado com óleo diesel após 30 dias da semeadura.....	84
Figura 5. Avaliação de crescimento de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30, 60, 90 e 210 dias de plantio em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	85
Figura 6. Comprimento do caule de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30, 60, 90 e 210 dias em experimento com substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	86
Figura 7. Avaliação de crescimento de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30, 60, 90 e 210 dias de plantio em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	87
Figura 8. Tricomas radiculares e secções longitudinais do ápice da raiz de <i>Canavalia ensiformis</i> após 90 dias em substrato não contaminado e substrato contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	88
Figura 9. Secções transversais de raízes secundárias de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 e 90 dias da semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	89
Figura 10. Secções transversais de raízes secundárias de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 e 90 dias da semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	90
Figura 11. Secções transversais do eofilo de <i>Canavalia ensiformis</i> após 30 e 90 dias da semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	91
Figura 12. Vista frontal e secções transversais do metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i> aos 90 dias após a semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%.....	92
Figura 13. Secções transversais e corte paradérmico do eofilo e metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i> aos 90 dias após a semeadura em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel a 6%, 12% e 25%, indicando compostos fenólicos marcados pelo teste com cloreto férrico e azul de toluidina.....	93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Avaliação morfofisiológica de mudas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel.....	21
Tabela 1. Características do substrato e propriedades físico-químicas do óleo diesel.....	43
Tabela 2. Mensurações da raiz e folha (metafilo) de <i>Canavalia ensiformis</i>	44
CAPÍTULO II - Avaliação da germinação e desenvolvimento de <i>Canavalia ensiformis</i>	54
Tabela 1. Características do substrato e propriedades físico-químicas do óleo diesel.....	79
Tabela 2. Mensurações da raiz de <i>Canavalia ensiformis</i>	80
Tabela 3. Mensurações do eofilo e metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i>	80
Tabela 4. Teor de clorofila total e carotenóides no eofilo e metafilo de <i>Canavalia ensiformis</i>	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERÊNCIAS	16
3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	20
CAPÍTULO I – Avaliação morfofisiológica de mudas de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel.....	21
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados	31
Discussão.....	33
Agradecimento	37
Referências	38
Tabelas e Figuras	43
CAPÍTULO II – Avaliação da germinação e desenvolvimento de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel....	54
Abstract	56
Resumo	57
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultados	63
Discussão.....	69
Agradecimento	74
Referências	74
Tabelas e Figuras	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
APÊNDICE	95

1 INTRODUÇÃO

Devido à intensa industrialização, danos ambientais são inevitáveis e cada vez mais frequentes nas grandes cidades (Agamuthu, 2010). A indústria do petróleo, por exemplo, é responsável por gerar uma quantidade significativa de hidrocarbonetos e promover a poluição do ar, solos, rios, mares e águas subterrâneas e isso se tornou um dos principais problemas ambientais atuais (Adebusoye *et al.*, 2010). A contaminação dos solos com hidrocarbonetos aumentou a partir dos anos 80, gerando preocupação devido aos efeitos negativos no ambiente (Xu e Johnson, 1997).

O óleo diesel é um derivado do petróleo composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, como alcanos lineares e ramificados de baixo peso molecular (que são potencialmente fitotóxicos) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (Adam e Duncan, 1999; Adebusoye *et al.*, 2010), como naftaleno, fenantreno, benz[a]antraceno e benz[a]pireno (Alkio *et al.*, 2005). Os HPAs geram grande preocupação, pois uma vez no ambiente, sua remoção é dificultada devido a sua característica persistente no solo (Adam e Duncan, 1999). Com isso, aumentou o número de estudos da problemática e na busca por novos métodos que removam do solo os hidrocarbonetos do petróleo (Hutchinson *et al.*, 2001). Alguns contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos de petróleo, podem ser submetidos a tratamentos microbiológicos (Cunningham *et al.*, 1995).

Dentre as técnicas de descontaminação ambiental, se destaca a fitorremediação, técnica que utiliza plantas e seus microorganismos associados para remediar o contaminante no ambiente (Cunningham e Ow, 1996).

A técnica de fitorremediação, além de ser utilizada em ambientes contaminados com petróleo, também é eficaz para tratamento de solos contaminados por metais (Romeiro *et al.*, 2007; De Almeida *et al.*, 2008), herbicidas (Pires *et al.*, 2003) e explosivos como TNT (Hughes *et al.*, 1997). As técnicas convencionais de descontaminação apresentam alto custo de operação e por isso estudos são feitos para encontrar alternativas mais baratas (Susarla *et al.*, 2002). A fitorremediação apresenta vantagens quanto a isso, pois tem baixo custo, além da utilização na área atingida (*in situ*); auxilia na manutenção do solo e estimula a vida dos micro-organismos; tem facilidade em ser combinada a outras técnicas tradicionais de descontaminação (Cunningham e Ow, 1996; Susarla *et al.*, 2002); remedia diversos contaminantes ao mesmo tempo (Andrade *et al.*, 2007); usa energia solar e apresenta alta aceitação pública (Trapp e Karlson, 2001; Susarla *et al.*, 2002). Apesar dessas vantagens, o processo de fitorremediação tem algumas limitações, pois sua eficiência depende do nível de toxidez do contaminante, das condições climáticas (Trapp e Karlson, 2001) e das alterações nas propriedades físicoquímicas do solo, como pH, concentração de oxigênio, umidade, presença de nutrientes, temperatura e solubilidade do composto em água (Trapp e Karlson, 2001; Andrade *et al.*, 2007). Apesar disso, recomenda-se a aplicação da fitorremediação em ambientes contaminados com óleo diesel uma vez que a contaminação ocorre superficialmente (Adam e Duncan, 1999).

O óleo diesel é fitotóxico (Baker, 1970), pois pode penetrar na planta e/ou modificar as condições do solo. A penetração do óleo na planta irá depender do tipo de óleo, da parte da planta que está em contato com o óleo (folhas ou raízes), a espessura de cutícula e a frequência dos estômatos (Baker, 1970). No solo o contaminante pode atuar como uma barreira física devido a sua natureza

hidrofóbica. Por tal motivo, solos contaminados com óleo tem tendência a ter suas condições de umidade alteradas, pois retém menor quantidade de água, além de apresentar alterações de temperatura (Merkl *et al.*, 2005), menor disponibilidade de nutrientes (De Jong, 1980) e restrição do movimento de oxigênio no solo (Pezeshki *et al.*, 2001).

Mesmo com tais adversidades, existem plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados com petróleo e óleo. Por isso, estudos preliminares são amplamente realizados para identificação de espécies tolerantes a solos contaminados. Estes estudos de toxidez podem iniciar por testes de germinação, o que reduzem os custos da pesquisa (Smith *et al.*, 2006) e permitem avaliar em curto prazo os efeitos de toxicidade aguda do contaminante na germinação e crescimento da planta (Banks e Schultz, 2005), ou a partir de mudas.

Estudos realizados com espécies vegetais em solos contaminados com petróleo e óleo diesel mostraram alterações, como aumento na divisão celular (Malallah *et al.*, 1996; Achuba, 2006), recuperação da biomassa (Nogueira *et al.*, 2011; Merkl *et al.*, 2005), aumento no comprimento da parte aérea (Nogueira *et al.*, 2011), e aumento no número de tricomas radiculares (Inckot *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2011). Outras plantas, porém podem ser prejudicadas pelo contaminante e apresentar alterações como necroses foliares (Alkio *et al.*, 2005; Gogosz *et al.*, 2010), redução no crescimento (Adam e Duncan, 1999; Alkio *et al.*, 2005; Merkl *et al.*, 2005; Achuba, 2006; Farias *et al.*, 2009; Gogosz *et al.*, 2010), redução da biomassa da parte aérea (Inckot *et al.*, 2011); inibição da germinação (Adam e Duncan, 2002), alteração celular na raiz (Bona *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2009) e diminuição no teor de clorofila das folhas (Achuba, 2006; Adenipekun *et al.*, 2008).

A família Fabaceae (Leguminosae) é representada por espécies de fácil adaptação e crescimento rápido, e são capazes de realizar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (gênero *Rhizobium*). Tal capacidade é uma boa característica para uma espécie fitorremediadora, pois solos contaminados com petróleo diminuem a disponibilidade de nitrogênio em decorrência do aumento da relação carbono/nitrogênio (Merkl *et al.*, 2004). *Canavalia ensiformis* (L.) DC. é uma leguminosa arbustiva anual, amplamente utilizada para adubação verde. Essa espécie apresenta potencial fitorremediador em solos contaminados com herbicidas (Pires *et al.*, 2003) e chumbo (Romeiro *et al.*, 2007; De Almeida *et al.*, 2008). Pode ainda ser uma espécie potencialmente fitorremediadora de solos contaminados com petróleo, pelo fato de ter facilidade em adaptação a condições adversas do solo (Espindula *et al.*, 2005), boa produção de biomassa (Lopes, 2000) raízes profundas e rápido crescimento (Alvarenga *et al.*, 1995).

2 REFERÊNCIAS

ACHUBA, F.I. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **The Environmentalist**, n. 26, p. 17-20, 2006.

ADAM, G. & DUNCAN, H.J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environmental Geochemistry and Health**, n. 21, p. 353–357, 1999.

ADAM, G. & DUNCAN, H.J. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363–370, 2002.

ADEBUSOYE, S.A.; ILORI, M.O.; OBAYORI, O.S.; OYETIBO, G.O.; AKINDELE, K.A. & AMUND, O.O. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. **Environmentalist**, v. 30, p. 24–34, 2010.

ADENIPEKUN, C.O.; OYETUNJI, O.J. & KASSIM, L.Q. Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. **Environmentalist**, v. 28, p. 446–450, 2008.

AGAMUTHU, P.; ABIOYE, O.P.; ABDUL AZIZ, A. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 891–894, 2010.

ALKIO, M.; TABUCHI, T.M.; WANG, X.; COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, 2005.

ALVARENGA, R.C.; DA COSTA, L.M.; MOURA FILHO, W. & REGAZZI, A. J. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 175-185, 1995.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 176p., 2007.

BAKER, J.M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, v. 1, n. 1, p. 27-44, 1970.

BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 167, n.1-4, p. 211-219, 2005.

BONA, C.; Da SILVA, M.Y.B.; REZENDE, I.G.; SANTOS, G.O; SOUZA, L.A.; INCKOT, R.C. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Anacardiaceae). **Acta Botanica Brasilica** v. 25, n. 2, p. 277-285, 2011.

CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R.; HUANG, J.W. Phytoremediation of contaminated soils. **Trends Biotechnology**, v. 13, p. 393-397, 1995.

CUNNINGHAM, S.D; OW, D.W. Promises and Prospects of Phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p 715-719, 1996.

De ALMEIDA, E.L.; MARCOS, F.C.C.; SCHIAVINATO, M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; De ABREU, M.F. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 569-576, 2008.

DE JONG, E. The effect of a crude oil spill on cereals. **Environmental Pollution**, v. 22, p. 187-196, 1980

ESPINDULA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: EMBRAPA. **Agroecologia: Princípios e Técnicas para uma Agricultura Orgânica Sustentável**. Brasília. Ed. Informação Tecnológica, p. 437-451, 2005.

FARIAS, V. De; MARANHO, L.T.; VASCONCELOS, E.C. De; CARVALHO-FILHO, M.A. da S.; LACERDA, L.G.; AZEVEDO, J.A.M.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 157, p. 10–22, 2009.

GOGOSZ, A.M.; BONA, C.; SANTOS, G.O.; BOTOSSO, P.C. Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum contaminated soil and bioremediated soil. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n. 4, p. 977-986, 2010.

HUGHES, J. B.; SHANKS, J.; VANDERFORD, M.; LAURITZEN, J.; BHADRA, R. Transformation of TNT by Aquatic Plants and Plant Tissue Cultures. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 1, p. 266-271, 1997.

HUTCHINSON, S. L.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of aged petroleum sludge. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, 395-403, 2001.

INCKOT, R.C.; BONA, C.; SOUZA, L.A. de.; SANTOS, G. de O. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. **Rodriguesia**, v. 59, n. 3, p. 513-524, 2008.

INCKOT, R. C.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A. de; BONA, C. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Flora**, v. 206, p. 261–266, 2011.

LOPES, O.M.N. Feijão-de-porco. Leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo. Altamira: Embrapa Comunicado Técnico 12, 1-4, 2000.

MALALLAH, G.; AFZAL, M.; GULSHAM, S.; ABRAHAM, D.; KURIAN, M.; DHAMI, M.S.I. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 2, p. 213–217, 1996.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth on tropical plants. **Biorremediation Journal**, v. 8, n. 3-4, p. 177-184, 2004.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the tropics influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 1, p. 86-91, 2005.

NOGUEIRA, L.; INCKOT, R.C.; SANTOS, G.O.; SOUZA, L.A.; BONA, C. Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. **Rodriguesia**, v.62, n. 3, p. 459-466, 2011.

PEZESHKI, S.R.; De LAUNE, R.D.; JUGSUJINDA, A. The effects of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 483-489, 2001.

PIRES, F.R.; De SOUZA, C.M.; Da SILVA, A.A.; De OLIVEIRA, S.P.; CECON, P.R.; Dos SANTOS, J.B.; Dos SANTOS, E.A. Seleção de plantas tolerantes ao tebuthiuron

e com potencial para fitorremediação. **Revista Ceres**, v. 50, n. 291, p. 583-594, 2003.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. D.; PEREIRA, B. F.F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* (L.) DC. **Bragantia**, v. 66, n.2, p. 327-334, 2007.

SMITH, M. J., FLOWERS, T. H., DUNCAN, H. J., ALDER, J. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 3, p. 519-525, 2006.

SUSARLA, S.; MEDINA, V. F.; McCUTCHEON, S. C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v. 18, p. 647–658, 2002.

TRAPP, S.; KARLSON, U. Aspects of Phytoremediation of Organic Pollutants. **Journal of Soils and Sediments**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2001.

XU, J. C.; JOHNSON, R. L. Nitrogen dynamics in soil with different hydrocarbons contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, v.77, n.3, p. 453-458, 1997.

3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação é composta por dois capítulos organizados de acordo com as normas das revistas a que foram/serão submetidos.

O capítulo I “Avaliação morfofisiológica de mudas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel” trata da análise da fisiologia e morfoanatomia de mudas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. em substrato contaminado com alta concentração de óleo diesel (95 ml diesel kg⁻¹). Este capítulo está de acordo com as normas da revista *Rodriguésia*, submetido em março de 2015.

O segundo capítulo, por sua vez, sob o título “Avaliação da germinação e desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel.”, foi definido a partir dos resultados obtidos no primeiro capítulo. Foram realizadas as mesmas análises fisiológicas e morfoanatômicas, porém nesse segundo trabalho, o crescimento e desenvolvimento das plantas foram analisados desde a germinação das sementes. O substrato utilizado foi contaminado com diferentes porcentagens de óleo diesel (6%, 12% e 25%) e as coletas foram realizadas aos 30, 60, 90 e 210 dias a partir da semeadura. Este capítulo está de acordo com as normas da revista *Brazilian Journal of Biology* e será submetido no segundo semestre de 2015.

**CAPÍTULO I – Avaliação morfofisiológica de mudas de *Canavalia ensiformis*
(L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel**

Avaliação morfofisiológica de mudas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel

A.G.Balliana¹, B.B.Moura², A.A.Padial¹, R.C.Inckot³ e C.Bona¹

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Centro Politécnico, Jardim das Américas, Caixa Postal 19031, CEP 81531-970, Curitiba, PR, Brasil

² Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Departamento Biologia Vegetal, Instituto de Biologia. R. Monteiro Lobato, 255 - Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

³ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada. Av. Colombo, 5790, Jd. Universitário, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Projeto financiado pela Fundação Araucária

Cleusa Bona, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Jardim das Américas, Caixa Postal 19031, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brasil. E-mail: bonacleusa@gmail.com

Avaliação de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel.

Resumo

Avaliação morfofisiológica de mudas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel. Hidrocarbonetos do petróleo são tóxicos para a maioria das plantas, contudo, há espécies que são tolerantes e outras capazes de reduzi-los do ambiente. Este estudo teve por objetivo avaliar a tolerância de *Canavalia ensiformis* em substrato com óleo diesel. Foram analisados o crescimento, teor de clorofila e carotenoides e estrutura anatômica de raízes e folhas. Os dados foram comparados pela análise de variância unifatorial (ANOVA). As mudas foram submetidas a dois tratamentos: substrato não contaminado e contaminado com 95 ml óleo diesel kg⁻¹. O experimento foi conduzido durante 30 dias em casa de vegetação. Apesar da toxicidade e do baixo crescimento das plantas (comprimento da raiz e do caule, biomassa radicular e aérea, volume radicular, área foliar e teores de clorofila e carotenóides), estas mostraram capacidade de tolerância à contaminação por óleo diesel. Esta fica evidente pela emissão de novas raízes adaptadas anatomicamente (formação de aerênquima e meristema apical com alta taxa de mitose) ao substrato contaminado, produção de compostos fenólicos e ausência de danos celulares nos órgãos formados após o plantio.

Palavras-chave: Anatomia de raiz e folha, contaminação por hidrocarbonetos, feijão de porco.

Abstract

Morpho-physiological assessment of *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) seedlings growing under substrate contaminated with diesel oil. Petroleum hydrocarbons are toxic to most plants, however, few species can be tolerant and even able to reduce the environment contamination. This study aimed to evaluate *C. ensiformis* tolerance when growing on substrate contaminated with diesel oil. Growth parameters, chlorophyll and carotenoids levels, morphological structure of roots and leaves were evaluated and data were compared using analysis of variance (ANOVA). Seedlings were subjected to two treatments: substrate uncontaminated and contaminated with 95 ml kg⁻¹ of diesel oil. The experiment was conducted in greenhouse and least 30 days. Diesel oil was toxic to the plants, that presented lower growth values (root and stem length, root and shoot biomass, root volume, leaf area, and levels of chlorophyll and carotenoids) although, few individuals were able to tolerate high levels of contamination, evidenced by the growth of anatomically adapted new roots (aerenchyma), phenolic compounds production and no cellular damage in the organ formed after planting.

Key words: Root and leaf anatomy, hydrocarbon contamination, Jack bean.

Introdução

A intensificação das atividades industriais nos últimos anos promoveu também o aumento de acidentes ambientais, e isso impacta diretamente a fauna e a flora. A indústria do petróleo, por exemplo, é responsável por gerar uma quantidade significativa de hidrocarbonetos e promover a poluição do ar, solos, rios, mares e águas subterrâneas (Adebusoye *et al.* 2010). Acidentes com óleo diesel causam sérios prejuízos ao ambiente devido a persistência no solo (Huang *et al.* 2004) e toxicidade para plantas e animais (Kechavarzi *et al.* 2007). A toxicidade se deve principalmente a sua composição de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPHs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Adam & Duncan 1999; Adebusoye *et al.* 2010) que apresentam capacidade mutagênica (Zhan *et al.* 2013).

Diversas técnicas convencionais de descontaminação de solos (processos físicos, químicos e biológicos) são utilizadas para minimizar ou remover totalmente o contaminante do ambiente. Dentre elas, destaca-se a fitorremediação, uma técnica em ascensão, que utiliza plantas e seus microorganismos associados para remediar o contaminante no ambiente (Cunningham & Ow 1996). Essa técnica tem despertado interesse principalmente por ser uma alternativa barata de descontaminação (Cunningham *et al.* 1995) e por poder ser combinada às técnicas convencionais (Cunningham & Ow 1996).

O efeito da contaminação ambiental por petróleo e derivados na planta pode variar de acordo com a espécie e idade da planta, tipo e quantidade de óleo presentes no substrato, entre outros (Baker 1970). Antes de se iniciar o processo de fitorremediação, estudos prévios são necessários (Gerhardt 2009) para se conhecer a tolerância de cada espécie ao contaminante (Chen *et al.* 2013).

De modo geral, as propriedades da planta que favorecem a fitorremediação são a tolerância à poluição (Trapp & Karlson 2001), rápido crescimento e rápida produção de biomassa (Singh & Jain 2003), alta competitividade (Singh & Jain 2003), alta capacidade de absorção de nutrientes (Cunningham & Ow 1996), alta taxa de transporte (Cunningham & Ow 1996; Singh & Jain 2003) e grande acúmulo de substâncias de reserva (Cunningham & Ow 1996; Trapp & Karlson 2001). Espécies vegetais têm sido testadas em solos contaminados com petróleo e derivados apresentando bons resultados, como boa produção de biomassa (Merkl *et al.* 2005; Nogueira *et al.*, 2011), aumento de divisão celular (Malallah *et al.* 1996; Achuba 2006), aumento do comprimento radicular (Baker 1970), da parte aérea (Nogueira *et al.* 2011) e do número de tricomas radiculares (Inckot *et al.* 2008; Nogueira *et al.* 2011).

Solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo podem tornar o nitrogênio indisponível para a planta (Adam & Duncan, 2002). Nesse contexto, as espécies de leguminosas apresentam vantagens no processo de fitorremediação, pois as raízes fazem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Algumas espécies de leguminosas foram testadas em solo contaminado com petróleo e óleo diesel e tiveram bons resultados, como *Centrosema brasilianum* e *Calopogonium mucunoides* com boa produção de biomassa (Merkl *et al.* 2004), *Mimosa pilulifera* com altos valores de comprimento e biomassa da raiz (Inckot *et al.* 2011) e *Galega orientalis* com bom crescimento e nodulação (Suominen *et al.* 2000).

Canavalia ensiformis (L.) DC., é uma leguminosa da América do Sul, com distribuição pantropical e amplamente utilizada como adubo verde no Sul e Sudeste do Brasil (Lopes 2000). Apresenta características desejáveis para uma espécie fitorremediadora, como fácil adaptação às condições adversas do solo (Espindula *et al.* 2005), boa produção de biomassa (Lopes 2000), raízes profundas e rápido crescimento

(Alvarenga *et al.* 1995). Também há registros de adaptação dessa espécie em solos contaminados com herbicidas (Pires *et al.* 2003) e chumbo (Romeiro *et al.* 2007; De Almeida *et al.* 2008). Devido a essas características, o presente estudo teve como objetivo testar a tolerância de mudas de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado por óleo diesel. As mudas foram analisadas quanto à sobrevivência, crescimento e produção de biomassa, estrutura morfoanatômica e concentração de clorofilas e carotenóides. Formalmente, o trabalho visa testar as seguintes hipóteses: a) *C. ensiformis* não tem o crescimento comprometido e apresenta boa produção de biomassa na presença do óleo diesel; b) *C. ensiformis* não apresenta alterações significativas na morfoanatomia e nos teores de clorofila total e carotenóides em substrato contaminado por óleo diesel.

Material e Métodos

Sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. foram adquiridas de produtor comercial (Piraí Sementes, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e semeadas em bandejas plásticas, 30x25 cm, 10 cm de altura, com substrato vermiculita de granulometria fina. Foram germinadas 12 sementes por bandeja em 20 bandejas, totalizando 240 sementes e deixadas em casa de vegetação com irrigação automática por nebulização de aproximadamente 15s a cada 1 hora. Após 30 dias, 60 indivíduos foram selecionados (mesmo padrão de crescimento) para serem utilizados em dois tratamentos, um com substrato não contaminado (SNC) e outro com substrato contaminado com óleo diesel (SC). O substrato utilizado foi adquirido no comércio (Riga Comércio de Insumos, Curitiba, Paraná, Brasil) e a análise físico-química do mesmo foi realizada pelo Laboratório de Fertilidade do Solo, da Universidade Federal do Paraná (Tab. 1). Cada tratamento foi composto de 30 repetições (vasos de 5 litros), com uma muda por vaso.

Esses foram distribuídos de maneira aleatória, de forma a maximizar a distribuição dos tratamentos na casa de vegetação com uma área total de 20 m².

O substrato foi umedecido com 50% de sua capacidade de retenção máxima (CRM), tomando por base os trabalhos de Muratova *et al.* (2003) e Li *et al.* (1997). Para definição da quantidade de contaminante no substrato foi calculada a capacidade de retenção máxima de óleo (CRM) desse substrato umedecido a 50% de sua capacidade. A contaminação foi realizada com óleo diesel comercial (S500) (Tab. 1) 30 dias antes do transplante das mudas, com 50% do valor retido de óleo nesse substrato (95 ml diesel kg⁻¹ de substrato). O substrato foi coletado imediatamente após a contaminação para análise de hidrocarboneto total do petróleo, resultando em 22.219 mg kg⁻¹, valor considerado tóxico segundo a Norma Holandesa “*Soil Remediation Intervention Values*” (STI) (Vrom 1999) e superior aos valores utilizados nos trabalhos de Inckot *et al.* (2008) e Nogueira *et al.* (2011). Após a contaminação, o substrato foi distribuído em vasos de 5 litros, e aquele utilizado para o tratamento não contaminado foi umedecido com 50% de sua CRM (170 ml de água por kg de solo) e distribuída diretamente para os vasos.

Após o transplante das mudas, o experimento foi conduzido por um período de 30 dias. Durante o período experimental, as plantas foram mantidas em temperatura média de 31°C (mínimo 18,8°C, máximo 45,1°C), umidade média de 59% (mínimo 21%, máximo 96%) e radiação média durante o dia (8 h – 18 h) de 74,45 (mínimo 1,5 lux, máximo 892 lux). As plantas foram irrigadas por nebulização automática de aproximadamente 20s a cada 15min.

As plantas foram avaliadas quantitativa e qualitativamente ao longo do período experimental e ao término do experimento (após 30 dias). O comprimento do caule foi mensurado semanalmente com régua milimetrada. Após 30 dias, cinco plantas foram

selecionadas para mensuração do comprimento da raiz principal, volume radicular, biomassa da raiz e da parte aérea e a área foliar dos três folíolos (folha trifoliolada) do metafilo (primeira folha definitiva). Para análise anatômica, das cinco plantas, três foram selecionadas.

As mensurações de comprimento da raiz principal foram feitas com régua milimetrada. O volume radicular foi obtido pela imersão do órgão em proveta com água. A biomassa foi mensurada em balança de precisão (Modelo KN 320/3, KNWaagen, São Paulo, Brasil). Para a biomassa seca, as plantas foram deixadas em estufa de secagem por 48 horas a 45°C. A área foliar foi medida pelo programa ImageJ e digitalizadas a partir da imagem das folhas desidratadas.

Para as análises de teores de clorofila total e carotenóides, foi selecionada a região mediana do limbo do metafilo médio da primeira folha definitiva de cinco indivíduos de cada tratamento. Os pigmentos foram quantificados pela técnica de extração com acetona 80% em espectrofotometria UV/VIS (Engel & Poggiani 1991). Para a extração, amostras de 0,01 g de metafilo foram congeladas e maceradas manualmente em ambiente escuro. Os extratos foram diluídos em 10 ml de acetona 80%, centrifugados a 1750 rpm por três minutos e analisados em espectrofotômetro (SynergyTM HT, BioTek, Vermont, United States). Os resultados obtidos foram aplicados à fórmula de Lichtenthaler & Welburn (1983):

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ml}): 7,15 (A_{645}) + 18,71 (A_{663})$$

$$\text{Carotenóides } (\mu\text{g/ml}): (1000 A_{470} - 1,82 c_a - 85,02 c_b)/198$$

Sendo A_{663} clorofila A; A_{645} clorofila B; A_{470} carotenóides; c_a clorofila A calculada e c_b clorofila B calculada.

Para as análises anatômicas, as amostras de raízes secundárias foram coletadas na região apical, na zona de distensão (± 1 cm do ápice) e na porção basal. Nas plantas do

substrato contaminado as amostras foram retiradas de raízes que já estavam presentes no momento do plantio (denominadas de raízes velhas) e raízes novas formadas após o plantio. As análises de tricomas radiculares foram realizadas nas raízes terciárias. Estas foram coletadas, fixadas em glutaraldeído e formaldeído (Karnovsky 1965), passadas para álcool 70%, montadas em **lâminas** semipermanentes com gelatina glicerizada (Kaiser 1880 apud Kraus & Arduin 1997) e analisadas em microscopia de luz.

Para análise foliar, foi coletada a região mediana do limbo do eófilo e folíolo médio do metafilo para análise em vista frontal em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em cortes transversais em microscopia de luz. As amostras de raiz e folha foram fixadas em Karnovsky 1965.

As amostras de folha foram desidratadas em série ascendente de álcool etílico até álcool absoluto, por 2 h em cada volume; desidratadas via ponto crítico com CO₂ (CPD 030 – Critical Point Dryer, Bal-Tec, Wetzlar, Germany); afixadas em suporte metálico com fita adesiva de cobre; metalizadas com ouro (SCD 030 Balzers Union, FL 9496, Balzers, Liechtenstein) e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM – 6360-LV, Jeol, Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Para microscopia de luz as amostras foram desidratadas em série etílica ascendente até álcool 70%, preinfiltradas em resina (hidroxietilmetacrilato) e álcool 70% na proporção de 1:1 v/v e incluídas em resina pura com adição de ativador, conforme instruções do fabricante (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Todo o processo foi realizado sob vácuo. Cortes de 7 µm foram feitos em micrótomo de rotação (LEICA RM2145, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e corados com azul de toluidina (Pearse 1961). Amostras de eófilo e metafilo foram submetidas a testes com sudan III para detecção de lipídios (Sass 1951) e cloreto férrico para detectar compostos fenólicos (Johansen 1940). Amostras da raiz foram submetidas aos mesmos

testes, além de teste com floroglucinol para detectar lignina (Johansen 1940). Este foi realizado em cortes a mão livre com navalha descartável e montados em lâmina semipermanente com gelatina glicerizada (Kaiser 1880 apud Kraus & Arduin 1997).

Foram mensuradas a espessura total do limbo, do parênquima paliçádico e lacunoso a partir de lâminas permanentes para as análises quantitativas do eofilo e metafilo. Já para as análises quantitativas da raiz, foram mensurados o diâmetro total e do cilindro vascular, a espessura e o número de camadas do córtex. As mensurações foram realizadas em seis cortes de três indivíduos, totalizando em 18 amostras, em microscópio (Olympus CBA, Shinjuku, Tokyo, Japan) calibrado com auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada (ZEISS 5+ 100/ 100 mm, Oberkochen, Germany).

As variáveis foram comparadas entre tratamentos (com e sem contaminação) por meio de análise de variância unifatorial (ANOVA). Quando as análises dos resultados indicaram diferenças estatisticamente significantes entre médias dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste Tukey no nível 5% de probabilidade.

Resultados

Ao longo dos 30 dias de experimento, as plantas do substrato contaminado (SC) apresentaram escurecimento do caule e sintomas foliares como ressecamento e cloroses (Fig. 1a) e necroses (Fig. 1b). Após 30 dias de experimento, 100% das plantas do substrato não contaminado (SNC) e 16% das plantas do substrato contaminado (SC) sobreviveram.

Após 30 dias de experimento, as plantas do tratamento SNC apresentaram o sistema radicular muito ramificado e com nódulos (Fig. 1c, d). As plantas do tratamento SC tiveram sistema radicular pouco desenvolvido, total ou parcialmente necrosado e sem nódulos. No entanto, as plantas sobreviventes desse tratamento formaram novas raízes a partir da base do caule (Fig. 1e, f) ou a partir de raízes já existentes não

necrosadas (Fig. 1e). Essas plantas emitiram novas folhas que apresentaram sintomas como clorose e menor número de folhas em relação às plantas do tratamento SNC (Fig. 1g, h).

As plantas do tratamento SC apresentaram menores valores do comprimento da raiz principal (Fig. 2a), volume radicular (Fig. 2b), biomassa seca da raiz (Fig. 2c) e parte aérea (Fig. 2d), área foliar (Fig. 2e), teores de clorofilas e carotenoides (Fig. 2f) e comprimento do caule (Fig. 3) em relação as plantas do tratamento SNC.

Tricomas da raiz foram registrados com frequência ao longo das raízes terciárias das plantas do tratamento SNC (Fig. 4a). No tratamento SC, esses tricomas estavam ausentes ou raramente presentes e com tamanho reduzido (Fig. 4b).

O meristema apical das raízes secundárias apresentou aspecto normal nas plantas dos dois tratamentos (Fig. 4c, d). No entanto, nas plantas do tratamento SNC as células meristemáticas se prolongam por cerca de 600 μm (Fig. 4c), enquanto que no tratamento SC, as raízes novas apresentaram região meristemática mais prolongada, chegando a atingir cerca de 2.000 μm (Fig. 4d). Nesse caso, a vacuolização e diferenciação celular ocorreram mais afastadas do promeristema.

A raiz das plantas do tratamento SNC, em secção transversal, na zona de distensão, apresentou células epidérmicas arredondadas (Fig. 5a), com paredes periclinais externas ligeiramente espessadas e lignificadas (Fig. 6a). Nas plantas do tratamento SC, a epiderme das raízes velhas apresentou células achatadas e irregulares (Fig. 5b), com paredes delgadas e não lignificadas, já as raízes novas também apresentaram paredes delgadas e não lignificadas, porém células mais arredondadas (Fig. 5c, 6b). As plantas que cresceram no SNC e as raízes velhas das plantas no tratamento SC apresentaram córtex parenquimatoso com espaços intercelulares

reduzidos (Fig. 5d, 5e). No entanto, as raízes novas do tratamento SC apresentaram córtex aerênquimatoso com lacunas lisígenas evidentes (Fig. 5f).

Na região basal da raiz das plantas do tratamento SNC, em secção transversal, foi observado crescimento secundário, com periderme bem desenvolvida, súber evidente e córtex primário quase totalmente eliminado (Fig. 5g). No tratamento SC, as raízes velhas apresentaram lise celular no córtex e cilindro vascular funcional, porém com crescimento secundário menos desenvolvido (Fig. 5h). As raízes novas do tratamento SC apresentaram epiderme íntegra, córtex aerênquimatoso com grandes lacunas lisígenas e crescimento secundário inicial (Fig. 5i).

As variáveis quantitativas da raiz, na zona de distensão, não apresentaram diferença significativa entre as plantas dos tratamentos (Tab. 2). Na região basal da raiz, as mensurações do córtex não foram consideradas devido à perda deste durante o crescimento secundário das raízes das plantas do tratamento SNC. Nessa mesma região, o diâmetro do cilindro vascular foi significativamente maior nas plantas do tratamento SNC (Tab. 2).

A cutícula e a cera epicuticular do eófilo e metafilo não apresentaram alterações nas plantas do tratamento SC quando comparadas às das plantas em SNC (Fig. 7a-d). Ambas as folhas apresentaram estrutura celular normal, tanto da epiderme como do mesófilo, com pequenas variações no tamanho e formato (Fig. 7e-h). Nota-se no eófilo das plantas do tratamento SNC células do parênquima paliçádico mais alongadas do que no tratamento SC (Fig. 7e, f). Nos metafílos isto também foi observado (Fig. 7g, h) e essas alterações resultaram na redução da espessura total do limbo e do parênquima paliçádico dos metafílos das plantas do tratamento SC (Tab. 2). Também foram detectados compostos fenólicos nas células do mesófilo de ambas as folhas desse mesmo tratamento (Fig. 8).

Discussão

A formação rápida de novas raízes garantiu a sobrevivência de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. em substrato contaminado mesmo submetidas ao alto estresse da presença do óleo diesel. Estas se mostraram resistentes ao emitir novas folhas com estrutura e organização celulares semelhantes às plantas do tratamento SNC, isso devido à emissão de novas raízes. Da mesma forma, *Campomanesia xanthocarpa*, em solo contaminado com petróleo, respondeu com a formação de novas raízes após a necrose e morte da raiz principal (Gogosz *et al.* 2010). Nogueira *et al.* (2011), também relacionaram a formação de raízes laterais em *Allophylus edulis* ao solo contaminado com petróleo. O sistema radicular mais denso facilita a degradação do contaminante (Cunningham & Ow 1996), pois estimula o crescimento de microorganismos por meio de modificações das condições do solo (como aeração e umidade) e através da produção de exsudatos (como enzimas, mucilagens, metabólitos primários e secundários) (EPA 2000). Um sistema radicular denso é uma característica vantajosa na sobrevivência da planta em solo contaminado, o que as torna mais adequadas para o processo de fitorremediação (Pilon-Smits 2005).

O rápido crescimento de raízes novas nas plantas de *C. ensiformis* no tratamento SC fica evidente no corte longitudinal do ápice da raiz, cuja região meristemática é alongada, evidenciando alta taxa de mitose. Esse resultado é contrário ao que foi relatado para *Vigna unguiculata* (Achuba 2006), *Mimosa pilulifera* (Inckot *et al.* 2008), *Sebastiania commersoniana* (Bona *et al.* 2011) e *Allophylus edulis* (Nogueira *et al.* 2011), cuja região meristemática é reduzida na presença de hidrocarbonetos. Quando a planta está em condições de estresse, há alta produção de etileno e inibição do alongamento celular (Glick 2010), o que não ocorreu com *C. ensiformis* provavelmente

porque os níveis de auxina foram maiores aos do etileno e houve crescimento vertical normal na raiz.

Outra estratégia da planta na presença do contaminante foi formação de aerênquima nas raízes. O estresse causado pela redução de oxigênio no substrato provoca o aumento da produção de etileno na planta que resulta no aumento dos espaços intercelulares no córtex da raiz (He *et al.* 1992). Resultado semelhante foi registrado para *Sebastiania commersoniana* e *Schinus terebinthifolius* em solo contaminado com óleo diesel (Bona *et al.* 2011). Segundo os autores, a formação de aerênquima foi uma estratégia destas espécies para minimizar a possível falta de oxigênio no solo. *C. ensiformis* mostrou a mesma estratégia de sobrevivência. Por outro lado, em solos contaminados com petróleo e biorremediados, com menor nível de contaminação que o encontrado no presente estudo (TPH 13.651 mg kg⁻¹), não houve formação de aerênquima nas raízes de *Mimosa pilulifera* (Inckot *et al.* 2008) e *Allophylus edulis* (Nogueira *et al.* 2011). Essa estratégia anatômica conferiu resistência às plantas de *C. ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel.

É importante relatar que as raízes secundárias de *C. ensiformis* em ambos os tratamentos, estavam em diferentes estádios de desenvolvimento. As plantas do tratamento SNC apresentaram raízes bem estabelecidas e sistema radicular volumoso, diferentemente das raízes das plantas do tratamento SC, que tiveram seus tecidos necrosados. Consequentemente, todo o crescimento da planta também foi comprometido. Devido a isso, os baixos valores registrados de comprimento do caule, biomassa aérea, área foliar e os sintomas foliares (clorose) e menores teores de clorofila total e carotenóides provavelmente estão relacionados ao comprometimento do transporte ascendente de nutrientes e água (Taiz & Zeiger 2004), decorrente do sistema radicular comprometido. Além disso, os menores valores de espessura total do limbo e

do parênquima paliçádico dos metafilos podem ser decorrentes do estágio de maturação dos tecidos no momento da coleta, como registrado para *Sebastiania commersoniana* em solo contaminado com óleo diesel (Bona *et al.* 2011). Os autores atribuíram essa alteração ao surgimento tardio das folhas, como ocorreu em *C. ensiformis* submetida ao contaminante. Devido as novas raízes formadas em substrato contaminado, seria necessário um tempo maior de avaliação das plantas para verificar possível recuperação no crescimento.

Os menores teores de clorofilas e carotenóides encontrados nos metafilos de *C. ensiformis* no tratamento SC evidenciam uma resposta comum das plantas ao estresse ocasionado por poluentes. A degradação da clorofila é um sintoma utilizado como indicador de poluição ambiental (Smith *et al.* 1981; Malallah *et al.* 1996). Adenipekun *et al.* (2008) registraram para *Corchorus olitorius* uma taxa de clorofila inversamente proporcional a porcentagem de óleo no substrato. Contaminação por óleos causam a redução do teor de clorofila e da taxa fotossintética de acordo com a espécie, o tipo e quantidade de óleo (Baker 1970). De acordo com Odjegba & Sadiq (2002), modificações do solo causadas pelo óleo reduzem a disponibilidade de nutrientes nos solos e isso afeta os teores de clorofila. Green *et al.* (1996) atribuíram a redução dos teores de clorofila em *Tradescantia* em consequência, primeiramente ao estresse ocasionado pelo transplante das mudas para o solo contaminado com óleo diesel e em seguida mais evidente pela ação do óleo. Diferentemente, *C. ensiformis* não apresentou estresse por consequência do transplante, pois todas as plantas do tratamento SNC tiveram um bom desenvolvimento. As plantas foram prejudicadas principalmente por causa da alta toxidez do óleo diesel. O presente estudo evidencia que o sistema radicular de *C. ensiformis* foi afetado pela toxicidade do óleo diesel, o que reduziu a absorção de nutrientes e consequentemente resultou no baixo teor de clorofila.

A presença dos compostos fenólicos nas folhas de *C. ensiformis* indica a relação com o contaminante, uma vez que não foram registrados nas plantas do tratamento SNC. Estresse causa a formação de espécie reativa de oxigênio (ROS) em mitocôndrias e cloroplastos, e isto leva a danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios (Apel & Hirt 2004) e os compostos fenólicos são antioxidantes que reagem contra esses danos da oxidação celular (Silva *et al.* 2010). Bona *et al.* (2011) sugerem que a presença de compostos fenólicos nas folhas de *Sebastiania commersoniana* em solo contaminado por óleo diesel pode favorecer na resistência da planta ao contaminante e o mesmo pode ser sugerido para *C. ensiformis*.

Há estudos que comprovam que o tempo entre a contaminação do solo e o estabelecimento de mudas interfere na resposta da planta a contaminação (Bona *et al.* 2011) isso por que há a volatilização de compostos fitotóxicos. Contudo, ficou claro que para as mudas de *C. ensiformis* o período de 30 dias entre a contaminação e o plantio foi insuficiente para diminuir a toxicidade do solo sem que houvesse alteração no sistema radicular.

O nível de toxicidade do óleo diesel utilizado no experimento afetou o sistema radicular, o que levou aos resultados de crescimento e sobrevivência de *C. ensiformis*. Apesar disto, as plantas sobreviventes apresentaram formação rápida de novas raízes modificadas anatomicamente ao substrato contaminado e formação de novos órgãos com ausência de danos celulares. A indicação é que seja testada a germinação da planta diretamente no solo e com níveis mais baixos de concentração de contaminante.

Agradecimento

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto (nº10156), ao Departamento de Botânica e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelo uso dos laboratórios e equipamentos, ao CNPq pela concessão de bolsa da primeira autora.

Referências

- Achuba, F.I. 2006. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *The Environmentalist* 26: 17-20.
- Adam, G. & Duncan, H.J. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health* 21: 353–357.
- Adam, G. & Duncan, H.J. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* 120: 363–370.
- Adebusoye, S.A.; Ilori, M.O.; Obayori, O.S.; Oyetibo, G.O.; Akindele, K.A. & Amund, O.O. 2010. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. *Environmentalist* 30: 24–34.
- Adenipekun, C.O.; Oyetunji, O.J. & Kassim, L.Q. 2008. Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. *Environmentalist* 28: 446–450.
- Alvarenga, R.C.; Da Costa, L.M.; Moura Filho, W. & Regazzi, A. J. 1995. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30 (2): 175-185.
- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Baker, J. M. 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution* 1: 27-44.
- Bona, C.; Da Silva, M.Y.B.; Rezende, I.G.; Santos, G.O; Souza, L.A. & Inckot, R.C. 2011. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 25(2): 277-285.

- Chen, L.; Liu, X.; Zhang, X.; Liu, S.; Wei, J. & Xu, G. 2013. Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. *Plant and soil* 368: 355-363.
- Cunningham, S.D.; Berti, W.R. & Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Tibtech* 13: 393-397.
- Cunningham, S.D. & Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110: 715-719.
- De Almeida, E.L.; Marcos, F.C.C.; Schiavinato, M.A.; Lagôa, A.M.M.A. & De Abreu, M.F. 2008. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia* 67(3): 569-576.
- Engel, V.L. & Poggiani, F. 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 3(1): 39-45.
- EPA Environmental Protection Agency. 2000. Introduction to Phytoremediation. EPA/600/R-99/107.
- Espindula, J.A.A.; Guerra, J.G.M. & Almeida, D.L. 2005. Uso de leguminosas herbáceas para adubação verde. In: Aquino, A.M & Assis, R.I. *Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável*. 1ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. Pp. 435-451.
- Gerhardt, K.E.; Huang, X.D.; Glick, B.R. & Greenberg, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176: 20–30.
- Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367–374.

- Green, B.T.; Wiberg, C.T.; Woodruff, J.L.; Miller, E.W.; Poage, V.L.; Childress, D.M.; Feulner, J.A.; Prosch, S.A.; Runkel, J.A.; Wanderscheid, R.L.; Wlerma, M.D.; Yang, X.; Choe, H.T.; Mercurio, S.D. 1996. Phytotoxicity observed in *Tradescantia* correlates with diesel fuel contamination in soil. *Environmental and Experimental Botany* 36(3): 313-321.
- Gogosz, A.M.; Bona, C.; Santos, G.O. & Botosso, P.C. 2010. Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum contaminated soil and bioremediated soil. *Brazilian Journal of Biology* 70(4) 977-986.
- He, C.J.; Morgan, P.W. & Drew, M.C. 1992. Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen- or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiology* 98: 137-142.
- Huang, X.D.; El-Alawi, Y.; Penrose, D.M.; Glick, B.R. & Greenberg, B.M. 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution* 130: 465-476.
- Inckot, R.C.; Bona, C.; Souza, L.A. & Santos, G.O. 2008. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. *Rodriguesia* 59(3): 513-524.
- Inckot, R.C.; Santos, G.O.; Souza, L.A. & Bona, C. 2011. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora* 206: 261–266.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York, 523p.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A-138A.

- Kechavarzi, C.; Pettersson, K.; Leeds-Harrison, P.; Ritchie, L. & Ledin, S. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution* 145: 68-74.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro, 198p.
- Li, X.; Feng, Y. & Sawatsky, N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of biorremediated soils. *Plant and Soil* 192: 219-226.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburu, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.
- Lopes, O.M.N. 2000. Feijão-de-porco. Leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo. Altamira: Embrapa Comunicado Técnico 12, 1-4.
- Malallah, G.; Afzal, M.; Gulsham, S.; Abraham, D.; Kurian, M. & Dhami, M.S.I. 1996. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. *Environmental Pollution* 92(2): 213–217.
- Merkel, N.; Schultze-Kraft, R. & Infante, C. 2004. Phytoremediation in tropics- the effect of crude oil on the growth on tropical plants. *Biorremediation Journal* 8(3-4) 177-184.
- Merkel, N.; Schultze-Kraft, R. & Infante, C. 2005. Phytoremediation in the tropics influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution* 138(1): 86-91.
- Muratova, A.Y.; Turkovskaya, O.V.; Hubner, T.E. & Kusch, P. 2003. Studies of the efficacy of Alfalfa and Reed in the phytoremediation of hydrocarbon-polluted soil. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 681-688.
- Nogueira, L.; Inckot, R.C.; Santos, G.O.; Souza, L.A. & Bona, C. 2011. Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguésia* 62(3): 459-466.

- Odjegba, V.J. & Sadiq, A.O. 2002. Effects of spent engine oil on the growth parameters, chlorophyll and protein levels of *Amaranthus hybridus* L. The Environmentalist 22: 23–28.
- Pearse, A.G.E. 1961. Histochemistry: theoretical and applied. 2ed. London, 617p
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology. 56: 15-39.
- Pires, F.R.; De Souza, C.M.; Da Silva, A.A.; De Oliveira, S.P.; Cecon, P.R.; Dos Santos, J.B. & Dos Santos, E.A. 2003. Seleção de plantas tolerantes ao tebuthiuron e com potencial para fitorremediação. Revista Ceres 50(291): 583-594.
- Romeiro, S.; Lagôa, A.M.M.A.; Furlani, P.R.; Abreu, C.D. & Pereira, B.F.F. 2007. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* (L.) DC. Bragantia 66 (2): 327-334.
- Sass, J.E. 1951. Botanical Microtechnique. 2ed, Iowa State College Press, Iowa, 228p.
- Silva, M.L.C.; Costa, R.S.; Santana, A.S. & Koblitz, M.G.B. 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias 31(3): 669-682.
- Singh, O. V. & Jain, R. K. 2003. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. Applied Microbiology and Biotechnology 63 (2): 128-135.
- Smith, C.J.; Delaune, R.D. & Patrick Jr., W.H. 1981. A method for determining stress in wetland plant communities following an oil spill. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological 26(4): 297-304.
- Suominen, L.; Jussila, M.M.; Mäkeläinen, K.; Romantschuk, M. & Lindström K. 2000. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil. Environmental pollution 107: 239-244.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.

Trapp, S. & Karlson, U. 2001. Aspects of Phytoremediation of Organic Pollutants. *Journal of Soils and Sediments* 1(1): 1-7.

Vrom: Ministério de Planejamento Territorial e Meio Ambiente da Holanda. 1999. Lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea – Valores STI 6530.

Zhan, X.; Liang, X.; Xu, G. & Zhou, L. 2013. Influence of plant root morphology and tissue composition on phenanthrene uptake: Stepwise multiple linear regression analysis. *Environmental Pollution* 179: 294-300.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Características do substrato e propriedades físico-químicas do óleo diesel utilizado no experimento.

Características do substrato		Propriedades do óleo diesel (S500)	
pH	5,2	Composição:	
Alumínio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,0	Hidrocarbonetos aromáticos	
Cálcio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	6,7	Hidrocarbonetos parafínicos	
Magnésio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	3,7	Hidrocarbonetos naftênicos	
Potássio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,99	Enxofre	máx 500 mg/kg
Fósforo ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	34,10	Densidade	0,815 – 0,865 kg/m^3 a 20°C
Carbono (g dm^{-3})	50,3	Viscosidade	2,0-5,0 Cst a 40 °C
		T° de decomposição	400°C
		Condutividade elétrica	25 pS/m (mín.)

Table 1. Substrate features and physical-chemical characteristics of the diesel oil used for the experiment.

Tabela 2. Mensurações da raiz e folha (metafilo) de *Canavalia ensiformis* após 30 dias de plantio, em substrato controle (SNC) e contaminado com óleo diesel (SC). (n=3)

Mensurações em (µm)		SNC	SC	<i>f</i>	<i>P</i>
Diâmetro da raiz	Distensão	836,91±142,2	1057,32±345,8	1,7	0,25
Espessura córtex raiz	Distensão	316,77±63,8	409,92±158,1	0,54	0,6
Diâmetro do cilindro vascular raiz	Distensão	208,42±30,4	269,45±84,7	1,42	0,31
	Base	873,8 ^a ±290,3	363,35 ^b ±142,6	5,76	0,04
Espessura da folha		238,85 ^a ±44,7	162,31 ^b ±7,6	8,53	0,04
Espessura do Par. Paliçádico		115,73 ^a ±5,2	81,24 ^b ±2,8	100,8	0,0005
Espessura Par. Esponjoso		94,17±34,5	49,33±6,2	4,9	0,09

Table 2. Morphological parameters of root and leaves (metaphyll) of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment under no contaminated substrate (SNC) and contaminated substrate (SC). (n=3)

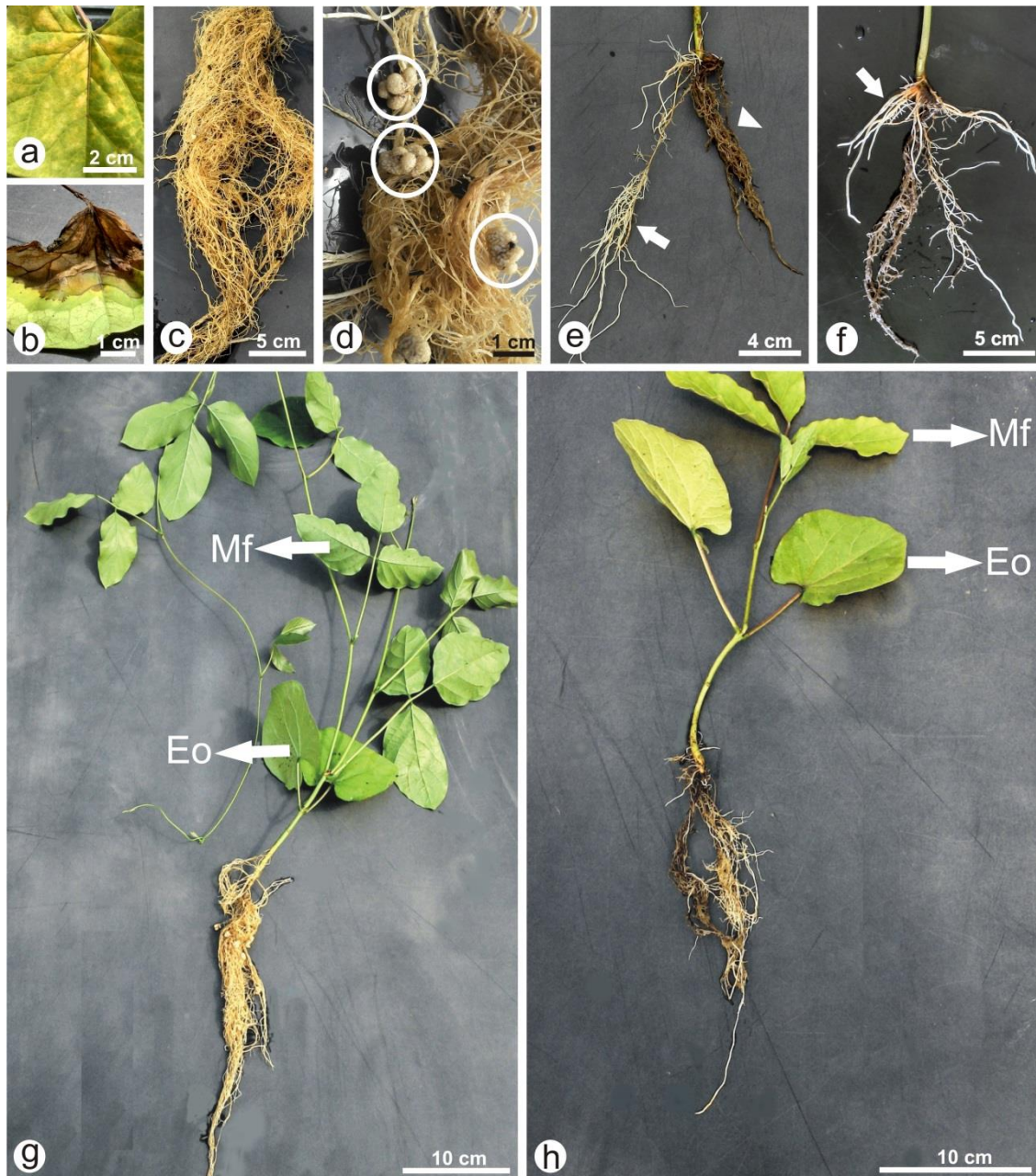


Figura 1. *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (c, d, g) e substrato contaminado com óleo diesel (a, b, e, f, h) após 30 dias. Eofilos com clorose (a) e necrose (b); c, d. Sistema radicular com raízes vivas com nódulos radiculares (c) (círculos); e. Sistema radicular evidenciando raízes necrosadas (cabeça de seta) e raízes novas a partir de raízes secundárias sobreviventes (seta); f. Sistema radicular com raízes novas originadas na base do caule (seta); g. Planta inteira com eofilo (Eo) e metafilo (Mf) normais; h. Planta inteira com eofilo (Eo) e metafilo (Mf) amarelados.

Figure 1. Plants of *Canavalia ensiformis* under no contaminated substrate (c, d, g) and under diesel oil contaminated substrate (a, b, e, f, h) after 30 days. Eophylls with chlorosis (a) and necrosis (b) blemish (b); c, d. Root system alive with nodules (d, circles); e. Necrosis on root system (arrowhead) and secondary root system growing from the same plant growing from the survived secondary roots (arrow); f. Root system with new roots growing from the stem base (arrow); g. Individual plant highlighting the healthy eophyll (Eo) and metaphyll (Mf); h. individual plant highlighting the yellow eophyll (Eo) and metaphyll (Mf).

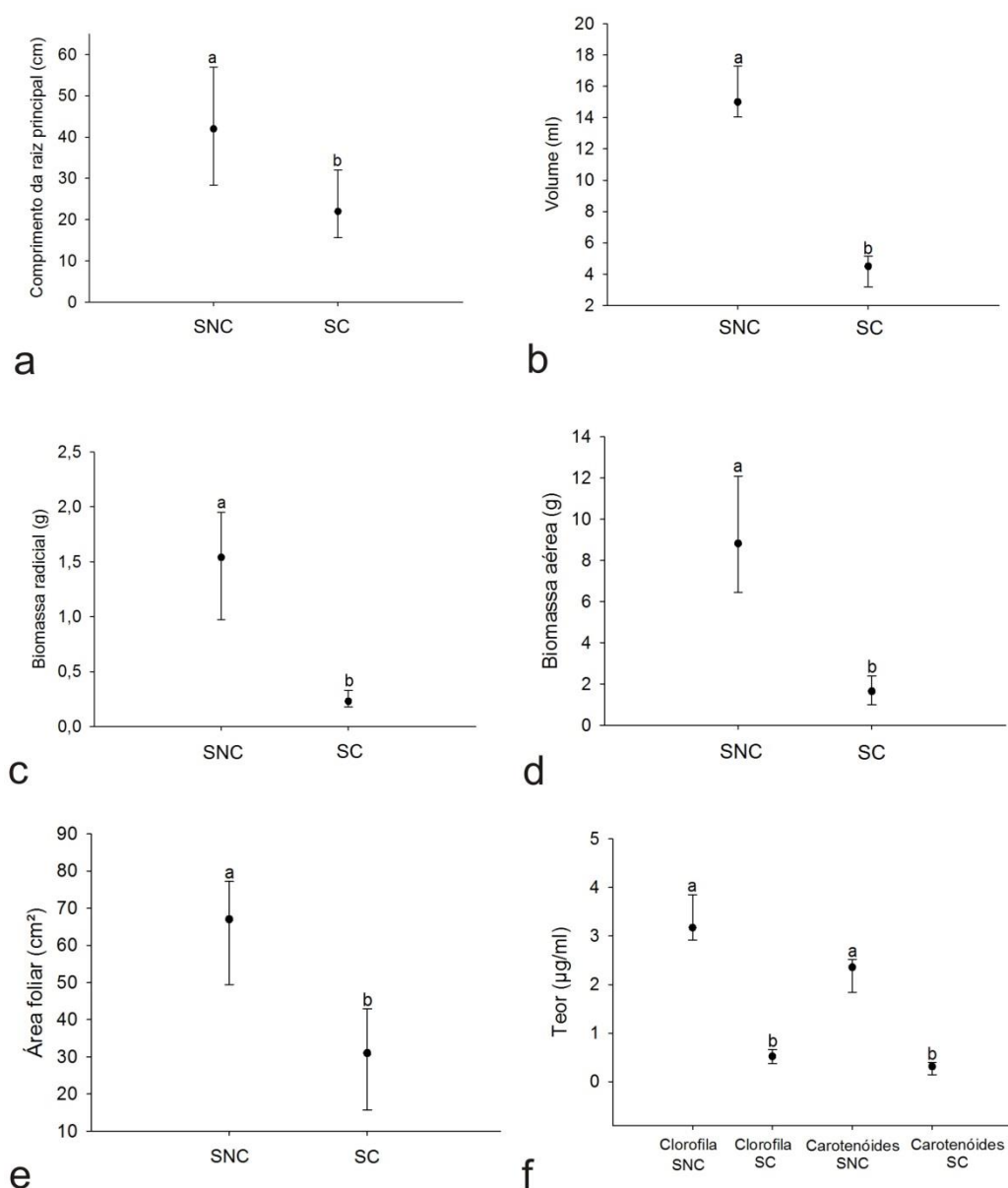


Figura 2. Avaliação do comprimento da raiz principal (a), volume radicular (b), biomassa seca da raiz (c) e parte aérea (d), área foliar (e), teores de clorofilas e carotenoides (f) de *Canavalia ensiformis* após 30 dias de plantio em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel (SC). Barras indicam o erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$). (n=5)

Figure 2. Evaluated parameters in *Canavalia ensiformis* 30 days after the experiment; stem length (a), root volume (b), root dry biomass (c), below-ground biomass (d), leaf area (e), chlorophyll and carotenoids levels (f) along the experiment growing under no contaminated substrate (SNC) and contaminated substrate (SC). Mean and standard error are represented with different letter indicated statistical significant difference among the treatments ($p < 0.05$). (n=5)

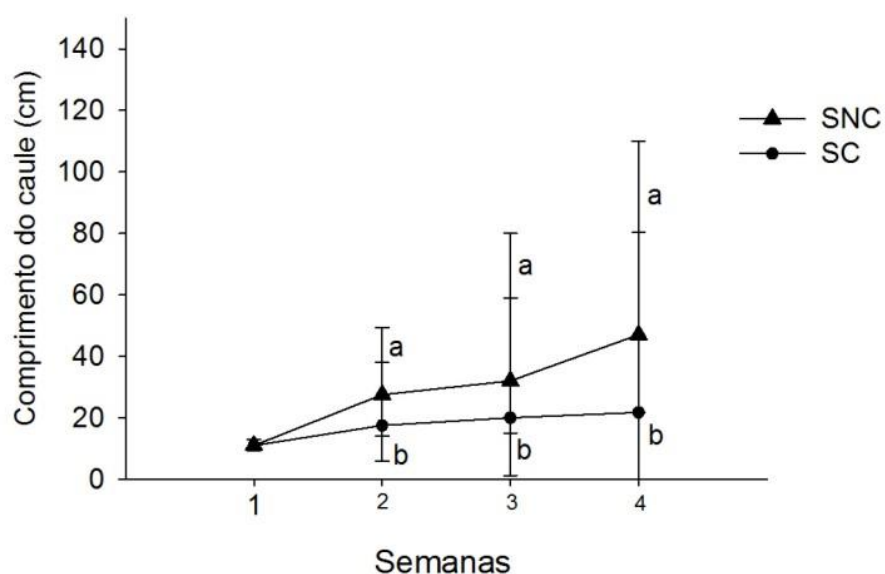


Figura 3. Avaliação do comprimento do caule de *Canavalia ensiformis* durante 30 dias de experimento em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel (SC). Barras indicam o erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$). (n=30)

Figure 3. Evaluated stem length in *Canavalia ensiformis* during 30 days of experiment growing under no contaminated substrate (SNC) and contaminated substrate (SC). Mean and standard error are represented with different letter indicated statistical significant difference among the treatments ($p < 0.05$). (n=30)

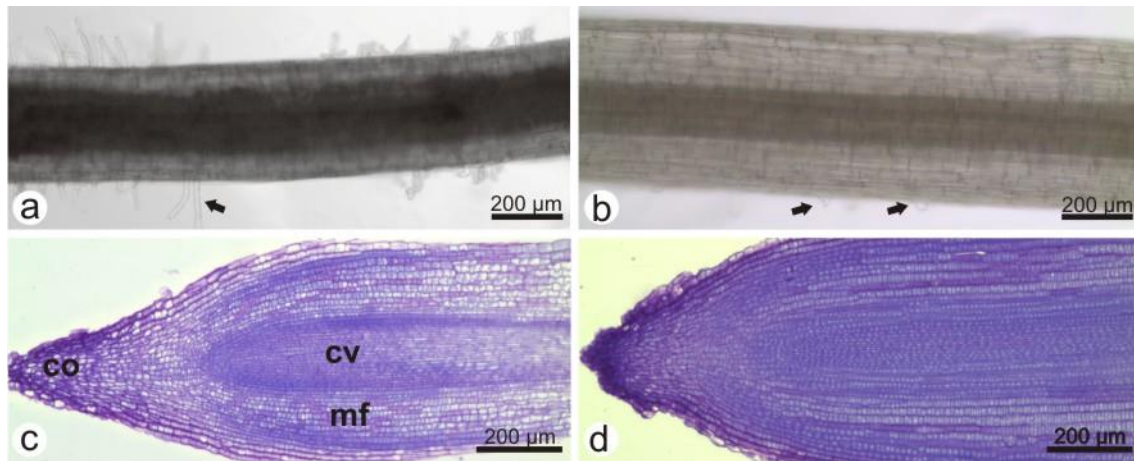


Figura 4. Raiz de *Canavalia ensiformis* após 30 dias do plantio. a, b. Vista frontal de raiz terciária em substrato não contaminado e contaminado evidenciando tricomas em (a) e primórdios de tricomas em b (seta); c, d. Secção longitudinal de meristema apical da raiz em SNC (c) e SC (d), coifa (co), meristema fundamental (mf) e cilindro vascular (cv), notar região meristemática mais prolongada em d.

Figure 4. Root of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment. a, b. Paradermic view of a tertiary root that has grown under no contaminated substrate and contaminated substrate exhibiting full developed tricomes (a) and early developed trichomes (b, arrow); c, d. Longitudinal section of root apical meristem from SNC (c) and SC (d), root cap (co), fundamental meristem (mf) and vascular cylinder (cv), note the meristem region more prolonged d.

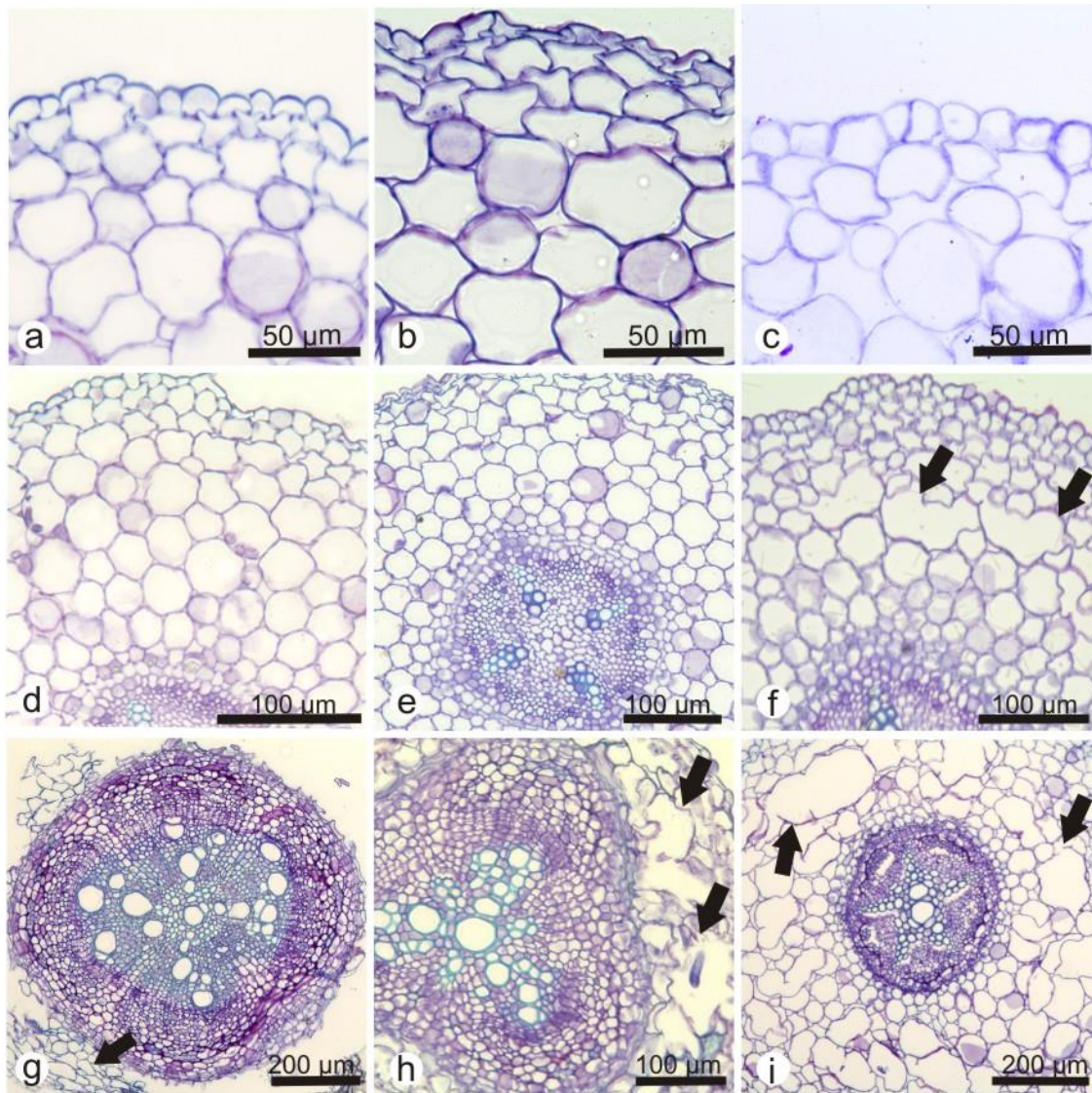


Figura 5. Secção transversal de *Canavalia ensiformis* após 30 dias do plantio em substrato não contaminado (a, d, g), raiz velha em substrato contaminado (b, e, h) e raiz nova em substrato contaminado (c, f, i). a-f. Região apical. Observar células da epiderme irregulares e achatadas em b e lise nas células corticais em f (seta); g-i. Região basal, observar córtex totalmente eliminado (g, seta), lacunas lisígenas (h, seta) e crescimento secundário inicial e lacunas lisígenas no córtex (i, seta).

Figure 5. Transversal section of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment. No contaminated substrate (a, d, g), older root of contaminated substrate (b, e, h) and newer root of contaminated substrate (c, f, i). a-f. Root apical region, note the irregular and flattened cells epidermis (b) and cortical cell lysis (f, arrow); g-i. Root basal region, note the cortex been removed (g, arrow), lysigenous aerenchyma (h, arrow) and the beginning of the secondary growth and lysigenous aerenchyma (i, arrow).

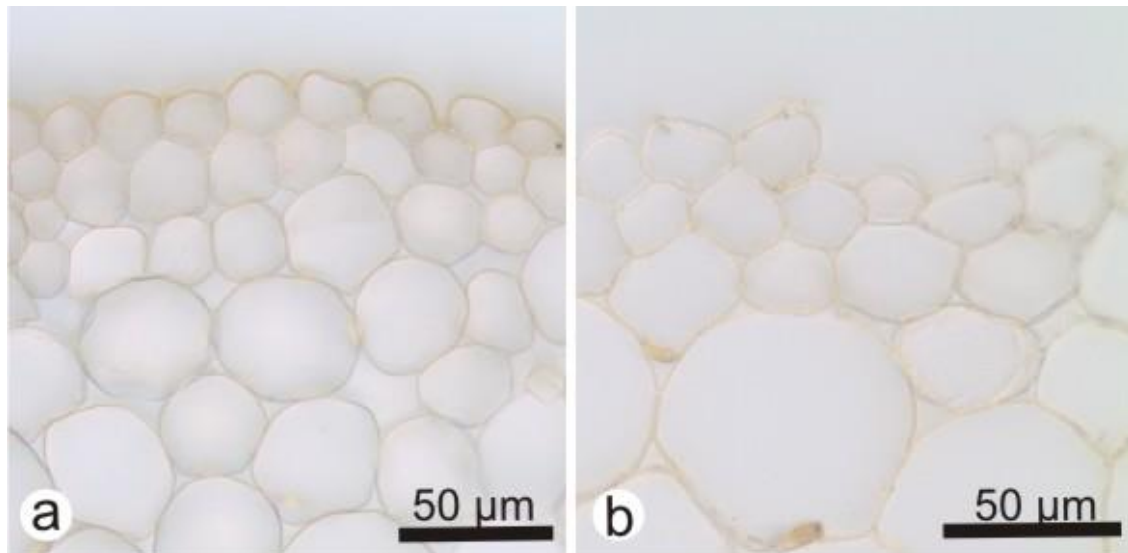


Figura 6. Teste com floroglucinol na região apical da raiz de *Canavalia ensiformis* após 30 dias do plantio. Substrato não contaminado (a) e contaminado (b). Notar parede mais (a) e menos lignificada (b).

Figure 6. Phloroglucinol test in the apical root region of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment. No contaminated substrate (a) and contaminated substrate (b). Note the stronger lignification of cell walls (a) compared to weaker lignification (b).

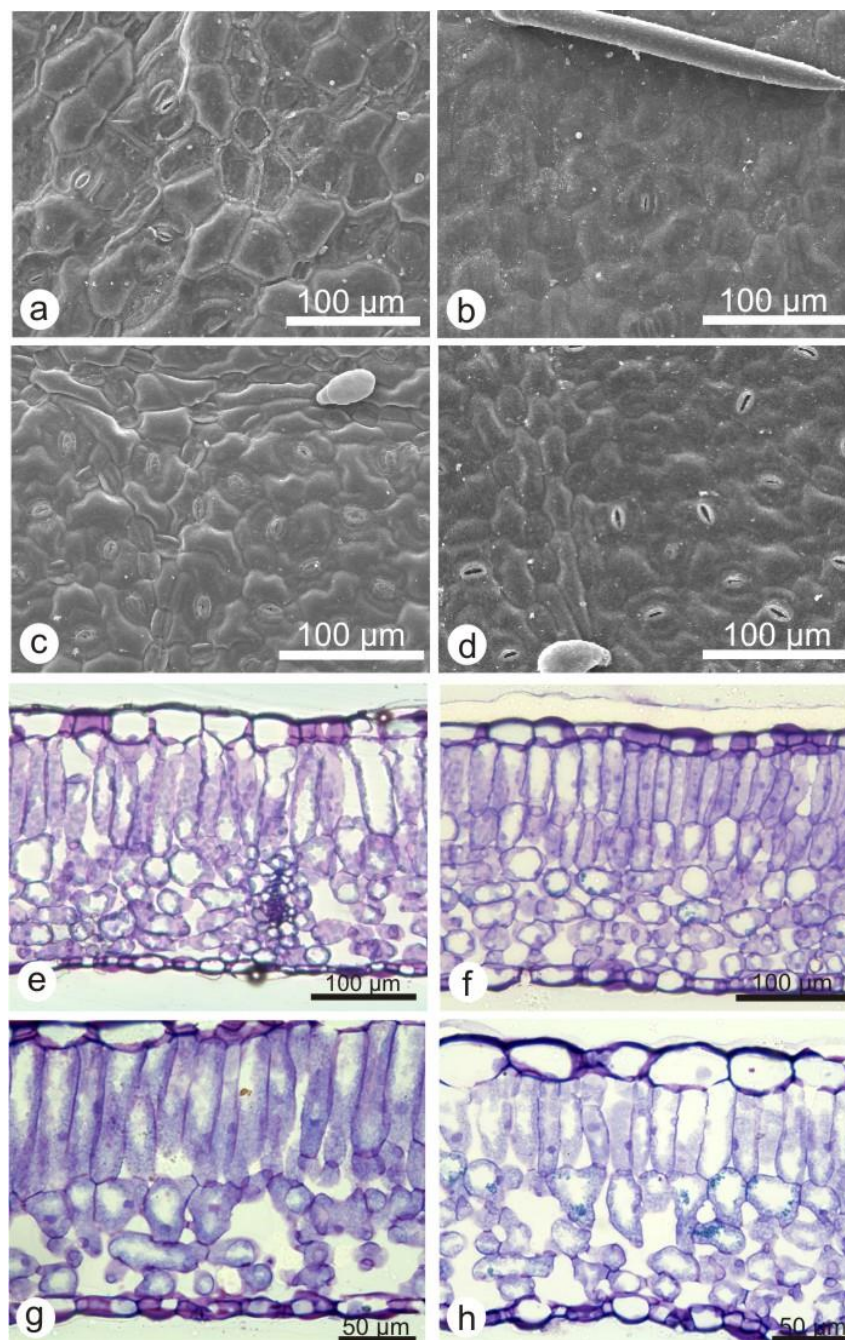


Figura 7. Superfície foliar do metafilo (a-d) e secções transversais do eofilo (e, f) e metafilo (g, h) de *Canavalia ensiformis* após 30 dias de experimento em substrato não contaminado (a, b, e, g) e em substrato contaminado com óleo diesel (c, d, f, h). Superfície foliar nas faces adaxial (a, c) e abaxial (b, d) em microscopia eletrônica de varredura.

Figure 7. Metaphyll leaf surface (a-d) and eophyll (e, f) and metaphyll (g, h) transversal section of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment under uncontaminated (a, b, e, g) and contaminated soil (c, d, f, h). Adaxial (a, c) and abaxial (b, d) leaf surface under scanning electron microscopic.

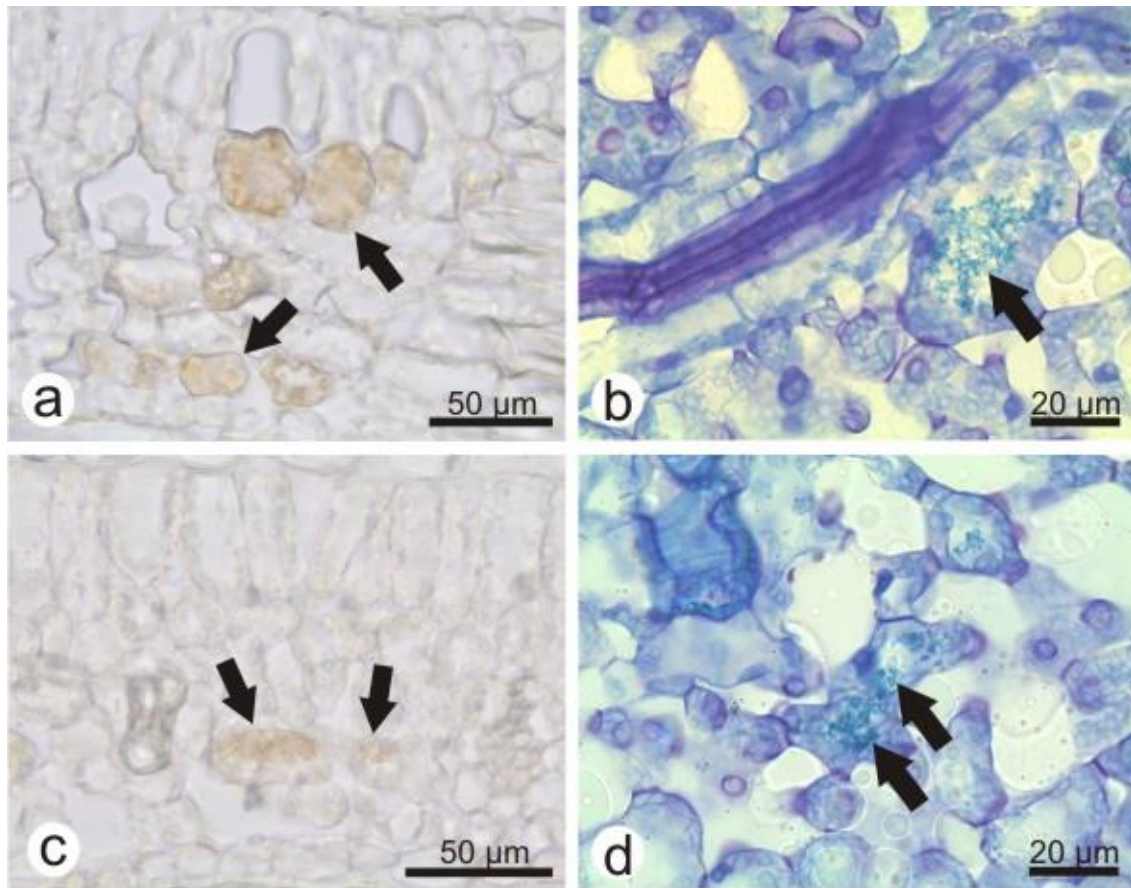


Figura 8. Secções transversal (a, c) e frontal (b, d) do eofilo (a, b) e metafilo (c, d) de *Canavalia ensiformis* após 30 dias de experimento em substrato contaminado com óleo diesel. Setas indicam compostos fenólicos marcados pelo teste com cloreto férrico (a, c) e azul de toluidina (b, d).

Figure 8. Eophyll (a, b) and metaphyll (c, d) transversal section (a, c) and leaf surface (b, d) of *Canavalia ensiformis* after 30 days of experiment under contaminated soil. Arrows indicate the phenolic compounds with ferric chloride test (a, c) and toluidine blue (b, d).

Capítulo II – Avaliação da germinação e desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel

**Avaliação da germinação e desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* (L.) DC.
(Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel**

A.G.Balliana¹, B.B.Moura², A.A.Padial¹, R.C.Inckot³ e C.Bona¹

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Centro Politécnico, Jardim das Américas, Caixa Postal 19031, CEP 81531-970, Curitiba, PR, Brasil

² Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Departamento Biologia Vegetal, Instituto de Biologia. R. Monteiro Lobato, 255 - Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

³ Universidade Estadual de Maringá (UEM), Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada. Av. Colombo, 5790, Jd. Universitário, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

(Com 13 figuras)

Palavras-chave: Germinação, feijão de porco, contaminação ambiental por hidrocarbonetos.

Análise de *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel

Cleusa Bona, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Jardim das Américas, Caixa Postal 19031, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brasil. E-mail: bonacleusa@gmail.com

Abstract

Environmental contamination by diesel oil is dangerous for the environment because the oil properties are highly toxic to animals and plants. Some plant species have not compromised development in polluted environments. The study evaluated the germination, growth and morphological and anatomical structure of *Canavalia ensiformis* (L.) DC. in substrate contaminated with different concentrations of diesel to understand the tolerance of the species in the presence of this contaminant. The seeds were germinated in a substrate uncontaminated and contaminated with diesel oil at the level of 6%, 12% and 25%. The experiment was conducted for 210 days in the greenhouse. The parameters evaluated were: number of germinated seeds, germination speed index, growth, chlorophyll and carotenoids levels, morphological structure of roots and leaves, and data were compared using analysis of variance two-way (ANOVA). The average of number of germinated seeds, IVG, root volume, dry weight of root and shoot (up to 60 days after sowing) did not differ between treatments. The main root length, metaphyll area, stem length at 60 and 90 days after sowing and shoot biomass at 90 days after sowing, had lower average when compared to substrate uncontaminated treatment. In all treatments, it was noted typically meristematic cells in the root tip and root formation of trichomes at 90 days after sowing. The plants showed tolerance to contamination levels for diesel and responded to stress. The diesel concentrations used were not toxic to the plants to dramatically affect the growth at all levels, and formation of root nodules, flowers and fruits were found.

Resumo

Avaliação da germinação e desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel. A contaminação do ambiente por óleo diesel causa danos ambientais, pois as propriedades do óleo são altamente tóxicas para animais e plantas. Porém, algumas espécies vegetais não tem o desenvolvimento comprometido em ambientes poluídos. O estudo avaliou a germinação, o crescimento e a estrutura morfoanatômica de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. em substrato contaminado com diferentes concentrações de óleo diesel. As sementes foram germinadas em substrato não contaminado e contaminado com óleo diesel ao nível de 6%, 12% e 25%. O experimento foi conduzido durante 210 dias em casa de vegetação. Os parâmetros avaliados foram: número de sementes germinadas, índice de velocidade de germinação (IVG), crescimento, teor de clorofila e carotenóides, estrutura morfológica de raízes e folhas, e os dados foram comparados pela análise de variância bifatorial (ANOVA). As médias referentes ao número de sementes germinadas, IVG e volume radicular não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. As biomassas secas da raiz e parte aérea teve aumento significativo apenas após 90 dias da semeadura. O comprimento da raiz principal, comprimento do caule aos 60 e 90 dias após a semeadura e biomassa aérea aos 90 dias após a semeadura, apresentaram menores médias quando comparados às plantas do tratamento em substrato não contaminado. A área do eófilo expandiu significativamente até 60 dias após a semeadura e para a área do metafilo, a expansão ocorreu de forma significativa após 90 dias. Em todos os tratamentos, notou-se células tipicamente meristemáticas no ápice da raiz e formação de tricomas radiculares aos 90 dias após a semeadura. As plantas apresentaram tolerância aos níveis de contaminação por óleo diesel e responderam ao estresse. As plantas

completaram o ciclo, deixando claro que as concentrações de 6%, 12% e 25% de óleo diesel não foram tóxicas para as plantas.

Introdução

A contaminação dos solos por petróleo e seus derivados, como o óleo diesel, se tornou comum e ocorre em escala global (Schwab *et al.*, 2006). Como o óleo diesel é composto por uma mistura de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPHs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Adam & Duncan 1999; Adebuseye *et al.* 2010), ele se torna tóxico para o ecossistema e para a saúde humana (Banks e Schultz, 2005). Além disso, os HPAs são compostos hidrofóbicos e altamente persistentes no meio ambiente (Enell, 2008), pois ficam adsorvidos nas partículas do solo e a degradação é lenta (Pereira Netto *et al.*, 2000).

Técnicas naturais de remediação têm sido desenvolvidas para atuar em solos contaminados por petróleo e derivados (Schwab *et al.*, 2006). Dentre elas destaca-se a fitorremediação, técnica que utiliza plantas e seus microorganismos associados para remediar o contaminante (Cunningham e Ow, 1996). A combinação de plantas e microorganismos resultou em uma abordagem mais eficiente no processo de descontaminação, especialmente de poluentes orgânicos (Gerhardt, 2009).

Algumas espécies de plantas são capazes de crescer e se desenvolver em solos altamente contaminados (Cunningham e Ow, 1996), porém o efeito do óleo depende também de vários fatores externos (Baker, 1970). Para maximizar a função fitorremediadora das plantas, estudos prévios são necessários para posterior utilização dessas em campo (Gerhardt, 2009). Embora algumas espécies apresentem redução na biomassa (Maranho *et. al.*, 2006; Inckot *et al.*, 2011), alterações radiculares (Alkio *et al.*, 2005; Bona *et. al.*, 2011a) e sintomas foliares (Alkio *et al.*, 2005; Gogosz *et al.*, 2010; Agamuthu *et al.*, 2010), podem ser tolerantes ao contaminante. No entanto, aquelas com

aumento da biomassa (Merkl *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2011), do comprimento radicular (Baker, 1970) e densidade de tricomas radiculares (Inckot *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2011) em solo contaminado, podem ser mais eficientes na fitorremediação.

Testes de germinação em solos contaminados permitem avaliar, em curto prazo, os efeitos de toxicidade do contaminante na germinação e crescimento da planta (Banks e Shultz, 2005; Chen *et al.*, 2013). A germinação pode ser inalterada na presença do petróleo e derivados, como em *Campomanesia xanthocarpa* (Gogosz *et al.*, 2010), *Mimosa pilulifera* (Inckot *et al.*, 2011) e outras leguminosas (Smith *et al.*, 2006) ou ser inibida como em *Zea mays* (Amakiri e Onofeghara, 1984) e *Acorus tatarinowii* (Chen *et al.*, 2013), devido tanto pelas características da planta quanto pelo nível de toxicidade do óleo.

Canavalia ensiformis (L.) DC. é uma leguminosa com características como boa produção de biomassa (Lopes, 2000), capacidade de se adaptar às condições adversas do solo (Espindula *et al.*, 2005), raízes que atingem grandes profundidades e rápido crescimento (Alvarenga *et al.*, 1995). Essa espécie mostrou boa adaptação em solo contaminado com herbicidas (Pires *et al.*, 2003) e chumbo (Romeiro *et al.*, 2007; De Almeida *et al.*, 2008). No entanto, o transplante de mudas de *C. ensiformis* em solo com alta concentração de óleo diesel foi pouco eficiente, por apresentar baixa taxa de sobrevivência (Balliana *et al.* dados não publicados). Novos estudos testando a capacidade de germinação e desenvolvimento da planta em diferentes concentrações de óleo e por um período de tempo mais longo são indicados.

O presente estudo teve por objetivo testar a germinação, crescimento e estrutura morfoanatômica de *C. ensiformis* em substrato contaminado com diferentes concentrações de óleo diesel (6%, 12% e 25%) e visa testar as seguintes hipóteses para

C. ensiformis: a) tem germinação inalterada na presença do óleo diesel; b) apresenta boa produção de biomassa na presença do óleo diesel em todos os níveis de contaminação; c) não apresenta alterações significativas na morfoanatomia e nos teores de clorofila total e carotenóides em substrato contaminado por óleo diesel.

Material e Métodos

As sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. foram compradas de produtor comercial (Piraí Sementes, Piracicaba – São Paulo) e o substrato utilizado foi adquirido em comércio (Riga Comércio de Insumos, Paraná, Brasil).

O substrato foi submetido à análise físico-química pelo Laboratório de Fertilidade do Solo, da Universidade Federal do Paraná (Tab. 1) e contaminado 30 dias antes da semeadura. Foi calculada a capacidade de retenção máxima de óleo (CRM) no substrato umedecido com água a 50% de sua capacidade (Li *et al.*, 1997; Muratova *et al.*, 2003) e a contaminação foi definida em 6% (11,8 ml diesel kg⁻¹), 12% (23,7 ml diesel kg⁻¹) e 25% (47,5 ml diesel kg⁻¹) a partir da metade da CRM, resultando em quatro tratamentos: substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel (SC) ao nível de 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). A contaminação foi realizada com óleo diesel comercial (S500) (Tab. 1) 30 dias antes da semeadura. Após a contaminação, os vasos (5 litros) foram deixados em casa de vegetação no Departamento de Botânicas da Universidade Federal do Paraná, com irrigação automática de 15 segundos a cada 1 hora. Cada tratamento foi composto por 15 repetições (vaso) e após 30 dias, foram semeadas cinco sementes em cada vaso. Após a germinação, foram mantidas duas mudas por vaso.

Após a semeadura, o experimento foi conduzido durante 210 dias. Durante o período experimental, as plantas foram mantidas em temperatura média de 21,5°C (mínimo 10,5°C, máximo 36,6°C), umidade média de 72% (mínimo 19%, máximo 96%)

e radiação média durante o dia (8h -18h) de 2.409,37 kJ/m² (mínimo 0 kJ/m², máximo 4.082 kJ/m²). Os vasos foram distribuídos de maneira aleatória, ocupando uma área total de 20 m², com irrigação por nebulização automática de aproximadamente 20 s a cada 30 min.

O número de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram determinados através da fórmula descrita por Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, sendo que: G1, G2 ... Gn correspondem ao número de plântulas computadas na primeira, segunda até última contagem e N1, N2 e Nn correspondem ao número de dias após o plantio das sementes.

As plantas foram avaliadas após 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 210 (T210) dias da semeadura. Para cada coleta, três plantas foram selecionadas para mensuração do comprimento do caule, comprimento da raiz principal, volume radicular, biomassa da raiz e da parte aérea e área foliar. Para coleta T30 e T90, além das análises citadas, foram realizadas também análises anatômicas.

As mensurações de comprimento da raiz principal e do caule foram feitas com régua milimetrada. Para a obtenção do volume radicular, o órgão foi imerso em proveta com água. As biomassas secas de raiz e parte aérea foram mensuradas em balança (Modelo KN 320/3, KNWaagen, São Paulo, Brasil) após secagem em estufa (48 horas a 45°). A área foliar do eófilo foi mensurada no T30, T60 e T90 e a área dos três folíolos (folha trifoliolada) do metafilo (primeira folha definitiva) foi mensurada no T60, T90 e T210, por meio do programa ImageJ a partir da imagem das folhas desidratadas.

Foram realizadas análises de teor de clorofila e carotenóides. Foram quantificadas amostras da região mediana do limbo do eófilo (para as plantas do T30 e T90) e metafilo médio da primeira folha definitiva eófilo (para as plantas do T90) pela técnica de extração com acetona 80% em espectrofotometria UV/VIS (Engel e

Poggiani, 1991). A técnica consiste na maceração em ambiente escuro de 0,01 g de folhas previamente congeladas e diluição deste em 10 ml de acetona 80%. Após, as amostras foram centrifugadas a 1750 rpm por três minutos, analisadas em espectrofotômetro (SynergyTM HT, BioTek, Vermont, United States) e os resultados aplicados na fórmula de Lichtenthaler e Welburn (1983).

Para as análises anatômicas, amostras de raízes e folhas de plantas do T30 e T90 foram coletadas e fixadas em glutaraldeído e formaldeído (Karnovsky, 1965). Para raiz, foram coletadas amostras na região apical, zona de distensão (± 1 cm do ápice) e região basal para análises em microscopia de luz. Foram realizadas análises de tricomas radiculares realizadas nas raízes terciárias. Estas foram fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), passadas para álcool 70%, montadas em lâminas semipermanentes com gelatina glicerizada (Kaiser, 1880 apud Kraus & Arduin, 1997) e analisadas em microscopia de luz.

Para análise foliar, amostras da região mediana do limbo do eófilo e folíolo médio do metafilo foram analisadas em vista frontal em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em cortes transversais em microscopia de luz. Em MEV, as amostras foram desidratadas em álcool etílico até álcool absoluto, permanecendo por 2h em cada concentração. Após, foram desidratadas via ponto crítico com CO₂ (CPD 030 – Critical Point Dryer, Bal-Tec, Wetzlar, Germany), coladas em suporte metálico com fita adesiva de cobre e metalizadas com ouro (SCD 030 Balzers Union, FL 9496, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM – 6360-LV, Jeol, Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Para microscopia de luz, as amostras tanto de raiz quanto de folha foram desidratadas em série etílica até álcool 70%, prefiltradas em solução de resina e álcool 70% (1:1 v/v) e incluídas em resina pura com ativador, seguindo instruções do

fabricante (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). As etapas foram realizadas a vácuo. Após montagem, foram feitos cortes de 7 μ m em micrótomo de rotação (LEICA RM2145, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e corados com azul de toluidina (Pearse, 1961).

Para testes histoquímicos em raiz e folha, amostras foram submetidas a testes com sudan III para detecção de lipídios (Sass, 1951), cloreto férrico para detectar compostos fenólicos (Johansen, 1940) e, apenas para amostras de raiz, floroglucinol para detectar lignina (Johansen, 1940). O teste com floroglucinol foi realizado em cortes a mão livre com navalha descartável e montados em lâmina semipermanente com gelatina glicerina (Kaiser, 1880 apud Kraus e Arduin, 1997).

A partir de lâminas permanentes, para as análises quantitativas do eófilo e metafilo no T30 e T90, foram mensuradas a espessura total do limbo, do parênquima paliádico e lacunoso. Para raiz, foram mensurados o diâmetro total e do cilindro vascular, a espessura e o número de camadas do córtex. As mensurações foram realizadas em seis cortes de três indivíduos, totalizando em 18 amostras, em microscópio (Olympus CBA, Shinjuku, Tokyo, Japan) calibrado com auxílio de uma lâmina de calibração micrometrada (ZEISS 5+ 100/ 100 mm, Oberkochen, Germany).

As variáveis foram comparadas por meio de análise de variância bifatorial (ANOVA). Quando a análise dos resultados indicou diferenças estatisticamente significantes entre médias dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste Tukey no nível 5% de probabilidade.

Resultados

O número de sementes germinadas não foi afetado significativamente pelo óleo diesel nos diferentes níveis de concentração (Fig. 1). O pico de germinação ocorreu no

quinto dia após a semeadura em todos os tratamentos, não havendo alteração na velocidade de germinação entre os tratamentos.

A emissão dos eofilos foi observada a partir do 17º dia e ao 30º dia, as plantas dos tratamentos SNC e contaminado encontravam-se em estágio semelhante de crescimento (Fig. 2A-D). Aos 60 dias após a semeadura, foi observado atraso na emissão das primeiras folhas definitivas (metafilo) das plantas dos tratamentos SC6 e SC12 quando comparados aos tratamentos SNC e SC25 (Fig. 2E-H). Após 90 dias da semeadura, as plantas dos tratamentos SC6 e SC12 emitiram maior número de folhas comparadas às plantas do tratamento SC25 (Fig. 3A-D). Após 210 dias, as plantas dos tratamentos SC6 e SC25 emitiram mais folhas em relação aos demais tratamentos (Fig. 3E-H).

O sistema radicular apresentou raiz principal com ramificação lateral semelhantes em todos os tratamentos (Fig. 2, 3), com exceção do tratamento SC25 no qual se apresentou menos ramificado após 90 e 210 dias (Fig. 3D, H). Até a análise de 90 dias não foram registrados nódulos em nenhuma planta. Aos 210 dias após a semeadura, as plantas de todos os tratamentos apresentaram nódulos radiculares (Fig. 3E-H) e completaram o ciclo com formação de flores e frutos.

A partir de 30 dias após a semeadura, foram observados, em todos os tratamentos contaminados, sintomas como necrose do caule (Fig. 4A) e sintomas foliares como necrose (Fig. 4B) e ressecamento (Fig. 4C). Clorose foi comum em todos os tratamentos (Fig. 4D). Esses sintomas se intensificaram ao longo do experimento. Até 30º dia, a mortalidade das plantas em substrato contaminado foi de 6% nos tratamentos SC6 e SC12 e de 20% no tratamento SC25. Aos 90 dias após a semeadura, o número de plantas mortas foi de 6% no tratamento em substrato não contaminado, 33% nos tratamentos SC6 e SC25 e 20% no tratamento SC12.

O comprimento da raiz principal apresentou redução de tamanho nas mensurações de 60 e 90 dias após a semeadura em relação às raízes do período de 30 dias, retomando o crescimento de forma significativa a partir dos 90 dias (Fig. 5A). Ao longo do experimento, os valores do comprimento da raiz principal foram significativamente maiores nas plantas do tratamento SNC em relação às que cresceram em substrato contaminado (Fig. 5B).

O volume radicular no tratamento SNC apresentou aumento significativo e gradual a partir dos 60 dias após a semeadura (Fig. 5C). Nos tratamentos com substrato contaminado, o volume radicular aumentou significativamente apenas no tratamento SC6, dos 90 aos 210 dias após a semeadura (Fig. 5C). Entre os tratamentos, só houve diferença significativa do volume radicular na mensuração de 60 dias entre os tratamentos SC6 e SC25. Nas demais mensurações, o volume radicular foi estatisticamente igual entre os tratamentos (Fig. 5C).

Até os 90 dias, a biomassa radicular sofreu incremento significativo apenas no tratamento sem contaminação (Fig. 5D). A partir dos 90 dias até 210 dias, a biomassa aumentou em todos os tratamentos, exceto no SC25 (Fig. 5D). Entre os tratamentos, só houve diferença estatística entre os tratamentos SC6 e SC25 na mensuração de 210 dias (Fig. 5D). A menor biomassa radicular foi registrada para as plantas do tratamento SC25 e a maior para as plantas do SC6 (Fig. 5D).

O crescimento da planta em relação ao comprimento do caule foi pouco significativo em todos os tratamentos até os 90 dias (Fig. 6). Após os 90 dias as plantas de todos os tratamentos cresceram significativamente (Fig. 6). Entre os tratamentos, aos 60 dias após a semeadura, houve menor crescimento nos tratamentos SC6 e SC12 em relação às plantas do substrato não contaminado (Fig. 6). Aos 90 dias após a semeadura, todas as plantas dos tratamentos contaminados apresentaram menor comprimento do

caule em relação às que cresceram em substrato não contaminado (Fig. 6). Aos 210 dias não houve diferença no crescimento entre os tratamentos (Fig. 6).

A biomassa aérea aumentou gradativamente, entre as mensurações, nas plantas do tratamento não contaminado e de forma significativa entre o T30, T90 e T210 (Fig. 7A). As plantas dos tratamentos contaminados tiveram aumento significativo de biomassa apenas após 90 dias de experimento. Entre os tratamentos, a biomassa aérea foi semelhante em todas as mensurações (Fig. 7A).

A área do eofilo cresceu significativamente dos 30 aos 60 dias e não significativamente dos 60 aos 90 dias (Fig. 7B), atingindo a maturidade neste período para as plantas de todos os tratamentos. Aos 210 dias, os eofilos não estavam presentes. A área foi estatisticamente maior nas plantas em substrato com maior porcentagem de contaminação (SC25) em relação, principalmente, aos tratamentos SNC e SC12 (Fig. 7C).

Até os 90 dias de experimento, os metafilos não expandiram de maneira significativa em todos os tratamentos. Um aumento significativo na área foliar foi observado apenas após esse período (Fig. 7D). Em todos os períodos de coleta, a área do metafilo das plantas do tratamento SNC foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos (Fig. 7D).

Tricomas radiculares foram registrados em todas as raízes terciárias após 90 dias, sendo a pilosidade mais densa nas raízes do tratamento SNC e SC6 (Fig. 8A, C, E, G). O meristema apical das raízes secundárias apresentou células tipicamente meristemáticas, sem alterações visíveis entre os tratamentos (Fig. 8B, D, F, H).

A raiz na região de distensão apresentou epiderme com células arredondadas em corte transversal e aspecto semelhante entre os tratamentos nas análises de 30 e 90 dias (Fig. 9). O córtex parenquimático apresentou pequenos espaços intercelulares nas

plantas de todos os tratamentos, na análise de 30 dias, e algumas células rompidas na análise de 90 dias das plantas do tratamento SC25 (Fig. 9H). O cilindro vascular encontrava-se em crescimento primário em todos os tratamentos, com quatro polos de protoxilema e metaxilema não diferenciado na análise de 30 dias (Fig. 9A, C, E, G). Na análise de 90 dias as plantas do tratamento SC25 apresentaram metaxilema completamente diferenciado (Fig. 9H).

Na região basal, as raízes das plantas de todos os tratamentos estavam em início de crescimento secundário na análise de 30 dias (Fig. 10A, C, E, G). A epiderme e o córtex permaneceram inalterados ou com raras lacunas corticais de origem lisígena (Fig. 10C). Nota-se a presença de xilema e floema secundários e instalação do felogênio na região do periciclo. Na maioria das raízes, em todos os tratamentos, a região central do cilindro vascular apresentou medula parenquimática. Após 90 dias, as plantas de todos os tratamentos estavam em estágio semelhante de crescimento secundário, ligeiramente mais avançado nas plantas do tratamento SNC. A periderme encontrava-se instalada, com súber evidente (Fig. 10B) ou em desenvolvimento (Fig. 10D, F, H) e córtex quase totalmente eliminado (Fig. 10B) ou rompido (Fig. 10D, F, H). Nos tratamentos SC12 e SC25 foram registrados vasos obliterados com conteúdo denso (Fig. 10F, H). Não foram evidenciadas alterações de lignificação ou suberização das paredes e nem a presença de compostos fenólicos (dados não mostrados).

O diâmetro total da raiz, na região de distensão, foi menor ou teve uma tendência de ser menor nas plantas do tratamento SNC (Tab. 2). Na região basal, não houve diferença entre os tratamentos e nas mensurações de 30 e 90 dias (Tab. 2). A espessura do córtex, na zona de distensão, foi menor nas plantas dos tratamentos SNC e SC6 em comparação com o SC12, somente na mensuração de 90 dias (Tab. 2). Na região basal, a espessura do córtex também foi significativamente menor nas plantas do

tratamento SNC, somente na mensuração de 30 dias (Tab. 2). Na mensuração de 90 dias, não foram consideradas as mensurações para o tratamento SNC devido à perda do córtex primário, na região basal da raiz. Não houve diferença significativa no diâmetro do cilindro vascular entre os tratamentos (Tab. 2).

A cutícula e a cera epicuticular do eofilo (Fig. 11) e metafile (Fig. 12) não apresentaram alterações nas plantas do tratamento SC nas análises de 30 e 90 dias. As espessuras do total do limbo do eofilo e do parênquima paliçádico foram semelhantes nas plantas de todos os tratamentos na mensuração de 30 dias (Tab. 3, Fig. 11). Após 90 dias, a espessura do limbo das plantas do tratamento SNC foi maior em relação à espessura nos demais tratamentos (Tab. 3), bem como a altura das células do parênquima paliçádico (Tab. 3; Fig. 11). Para o metafile, a espessura do limbo e a altura das células do parênquima paliçádico apresentaram uma tendência de redução nos tratamentos SC6 e SC12 e foi menor no SC25, em relação às plantas do SNC (Tab. 3; Fig. 12E-H). Não houve diferença significativa na espessura do parênquima esponjoso tanto para eofilo quanto metafile.

Compostos fenólicos não foram detectados no limbo do eofilo das plantas em todos os tratamentos na mensuração de 30 dias. Aos 90 dias, foram evidenciados compostos fenólicos nos eofilos apenas nos tratamentos contaminados e nos metafiles das plantas dos tratamentos SC6 e SC25 (Fig. 13).

Os teores de clorofila total e carotenóides dos eofilos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos após 30 dias de experimento (Tab. 4). Após 90 dias, o teor de clorofila total do eofilo foi menor somente no tratamento SC12 em relação ao tratamento SNC e não houve diferença nos teores de carotenóides (Tab. 4). No metafile não foram encontradas diferenças significativas nos teores de clorofila total e carotenóides (Tab. 4).

Discussão

O óleo diesel nas concentrações utilizadas no trabalho, não inibiu a germinação das sementes de *Canavalia ensiformis* e as plantas germinaram de maneira uniforme entre os tratamentos. O intervalo de tempo de 30 dias entre a contaminação e a semeadura pode ter sido o fator decisivo para uma boa germinação, pois ao longo do tempo, a toxidez do contaminante é reduzida devido a evaporação ou degradação dos componentes de menor peso molecular do óleo (Lin e Mendelssohn, 1998). Parece ocorrer uma relação direta entre a germinação e tempo de contaminação (Smith *et al.*, 2006). Essa hipótese também foi confirmada para *Schinus terebinthifolius*, com melhor resultado de germinação nos maiores intervalos de tempo entre a contaminação e o plantio (Bona *et al.*, 2011b). A redução da concentração de compostos voláteis do óleo diesel no substrato parece ser o fator que permite maior taxa de germinação (Adam e Duncan, 2002). Portanto, o tempo entre a contaminação e a germinação parece essencial para o bom desempenho das sementes.

Outro fator favorável a boa germinação de *C. ensiformis* foi a possível disponibilidade de água para semente. Apesar de haver informação na literatura sobre a redução na disponibilidade de água em solos contaminados, devido à formação de barreira hidrofóbica pelo óleo (Adam e Duncan, 2002), acredita-se que isso não ocorreu neste experimento, uma vez que as sementes foram depositadas no substrato após o processo de contaminação. Possivelmente o óleo recobriu as partículas de solo deixando-as hidrofóbicas e a água mais disponível para as sementes, favorecendo a germinação.

Até 30 dias após a semeadura, as plantas se desenvolveram de maneira semelhante entre os tratamentos, possivelmente porque todos os nutrientes necessários para o estabelecimento e desenvolvimento da planta foram adquiridos dos cotilédones.

No início do experimento, as plantas que cresceram em substrato com maior concentração de óleo diesel (25%) obtiveram o maior crescimento, o que confirma a maior disponibilidade de água no substrato mais contaminado.

Foi observada em *C. ensiformis* a tendência de quanto maior o nível de contaminação, maior o desenvolvimento do sistema radicular. A maior ramificação aumenta a superfície de contato das raízes para a absorção de água e nutrientes, favorecendo o crescimento da planta. O aumento das ramificações também pode ser atribuído à redução no comprimento da raiz principal, até os 90 dias, decorrente da necrose desse órgão. Como forma de compensação, quando há morte da raiz principal, há maior formação de raízes secundárias e consequentemente maior volume radicular, característica essa também registrada para *Campomanesia xanthocarpa* em solo contaminado com petróleo (Gogosz *et al.*, 2010). A capacidade de uma espécie em ramificar o sistema radicular em solos contaminados é uma característica essencial para a fitorremediação (Rentz *et al.*, 2003).

O crescimento de *C. ensiformis* foi mais lento até os 90 dias de experimento aumentando de maneira significativa, após esse período (T210), para as plantas de todos os tratamentos. Na análise de 210 dias, houve desenvolvimento de nódulos radiculares, flores e frutos em todas as plantas. A redução na toxidez do óleo com o passar do tempo (Lin e Mendelssohn, 1998), pode ter sido o fator que possibilitou o maior crescimento das plantas. Acredita-se que a formação de nódulos radiculares foi essencial para o bom desenvolvimento das plantas, pois solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo podem tornar o nitrogênio indisponível (Adam e Duncan, 2002). A simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio é vantajosa por disponibilizar esse nutriente para a planta. A conclusão do ciclo de vida das plantas de todos os tratamentos de forma uniforme indica que a espécie é capaz de se desenvolver em solos

contaminados com até 25% de óleo diesel e pode ser indicada como uma possível espécie fitorremediadora.

Além do aumento da ramificação radicular, outra adaptação das raízes na presença do óleo diesel foi o aumento da espessura do córtex e início de lise celular. O aumento da espessura do córtex é uma característica que provavelmente diminui o estresse causado pela redução do oxigênio no solo contaminado. E, a formação de aerênquima seria o resultado extremo a hipóxia, como registrado para *S. terebinthifolius* e *S. commersoniana* (Bona *et al.* 2011a). Nessas espécies, a espessura do córtex aumentou proporcionalmente à redução do tempo de volatilização entre a contaminação e o plantio (Bona *et al.* 2011a). Como *C. ensiformis* é capaz de formar aerênquima na raiz em solo com alta toxicidade (Balliana *et al.* dados não publicados), acredita-se que até o nível de 25% de contaminação não houve redução drástica de oxigênio no substrato contaminado e o aumento na espessura do córtex foi suficiente para reduzir o estresse da hipóxia.

Os níveis de óleo diesel utilizados no presente trabalho não afetaram a estrutura celular do meristema apical das raízes secundárias. A zona meristemática nas raízes dos tratamentos contaminados foi semelhante à das raízes do tratamento não contaminado. O estresse causado por hidrocarbonetos do petróleo e derivados, mais comumente, pode reduzir a região meristemática (Inckot *et al.*, 2008, Nogueira *et al.*, 2011, Bona *et al.*, 2011a) ou, em *C. ensiformis*, ampliar a zona meristemática, auxiliando no rápido crescimento da raiz em níveis extremos de contaminação (Balliana *et al.*, dados não publicados). Essa capacidade de *C. ensiformis* evidencia que essa espécie é capaz de tolerar diferentes níveis de contaminação por óleo diesel.

O óleo diesel também não afetou o teor de clorofila e carotenóides e a pequena redução no teor de clorofila no eófilo das plantas em substrato contaminado a 12% pode

ser mais fortemente relacionada à senescência (Taiz e Zeiger, 2004). Uma resposta das plantas aos poluentes ambientais é a redução nos teores de clorofila (Malallah *et al.*, 1998) devido a redução na disponibilidade de nutrientes para a planta (Odjegba e Sadiq, 2002). A taxa de clorofila em *Corchorus olitorius* (Adenipekun, 2008) e *Abelmoschus esculentus* (Adenipekun, 2009) diminuiu com o aumento da porcentagem de óleo no substrato. Os sintomas foliares observados nas plantas de *C. ensiformis* em substrato contaminado evidenciam um possível desequilíbrio nutricional no solo (Taiz e Zeiger, 2004). Porém, a ausência de alteração nos teores de clorofila em *C. ensiformis* denota que esse não foi drástico como evidenciados numa contaminação de 50% de óleo diesel (Balliana *et al.*, dados não publicados). Além disso, a intensa ramificação das raízes pode ter minimizado esse estresse.

Compostos fenólicos foram encontrados apenas nas folhas de *C. ensiformis* em substrato contaminado, o que indica a relação entre compostos fenólicos e o contaminante. Os compostos fenólicos são antioxidantes que reagem contra danos da oxidação celular (Silva *et al.*, 2010), e isso corrobora com Bona *et al.* (2011a) que sugerem que a presença de compostos fenólicos nas folhas de *Sebastiania commersoniana* crescendo em solo contaminado por óleo diesel pode favorecer na resistência da planta ao ambiente contaminado. A ausência de compostos fenólicos no limbo do eófilo das plantas após 30 dias sugere que os cotilédones garantiram a nutrição, minimizando o estresse. Esse ficou evidente após a queda dos cotilédones (90 dias) pela presença de compostos fenólicos nas folhas das plantas em substrato contaminado. É possível observar que os compostos fenólicos estavam distribuídos próximos ao sistema vascular. Sant'Anna-Santos *et al.* (2014) notaram que a contaminação do ar por fluoreto desencadeou o aparecimento de compostos fenólicos nas nervuras central e secundárias de *Spondias dulcis* e que o acúmulo de compostos

fenólicos no interior dos elementos de vasos provavelmente esteja ligado ao transporte do poluente pelos vasos do xilema. Os compostos fenólicos encontrados em *C. ensiformis* especialmente próximos de vasos condutores pode indicar uma relação na produção do mesmo com a translocação de algum composto que tenha estimulado a produção dos compostos fenólicos para a proteção das células.

No início do experimento, as plantas dos tratamentos contaminados investiram mais no sistema radicular em relação às plantas do não contaminado, possivelmente para minimizar a deficiência de nutrientes. Apesar de o sistema radicular estar bem desenvolvido em todos os tratamentos, as plantas dos tratamentos contaminados parecem ter tido deficiência nutricional, pois as folhas surgiram mais tarde e apresentaram os menores valores de espessura do limbo (eófilo e metafilo) e de área foliar (metafilo) em todas as análises. Quando em solo contaminado por petróleo e derivados, a espessura do limbo pode variar e ser maior (Maranho *et al.*, 2006), igual (Nogueira *et al.*, 2011) ou menor (Bona *et al.*, 2011a) em relação à espessura das folhas das plantas em solo controle. Apesar da menor espessura do limbo e área foliar, não houve alteração drástica da estrutura celular e dos teores de clorofila de *C. ensiformis*. Portanto, pode-se concluir que a redução em área e espessura foliar foi compensada pelo maior comprimento de caule, número de folhas e biomassa aérea. Essa capacidade de crescimento e adaptação de *C. ensiformis* ao substrato contaminado com óleo diesel, como já havia sido comprovada por Balliana *et al.* (dados não publicados), evidencia o potencial dessa espécie para ser utilizada em processos de fitorremediação (Singh e Jain, 2003).

Agradecimento

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto (nº10156), ao Departamento de Botânica e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR pelo uso dos laboratórios e equipamentos, ao CNPq pela concessão de bolsa da primeira autora.

Referências

- ADAM, G. and DUNCAN, HJ., 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 21, p. 353–357.
- ADAM, G. and DUNCAN, HJ., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, vol. 120, p. 363–370.
- ADEBUSOYE, SA., ILORI, MO., OBAYORI, OS., OYETIBO, GO., AKINDELE, KA. and AMUND, OO., 2010. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. *Environmentalist*, vol. 30, p. 24–34.
- ADENIPEKUN, CO., OYETUNJI, OJ. and KASSIM, LQ., 2008. Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. *Environmentalist*, vol. 28, p. 446–450.
- ADENIPEKUN, CO., OYETUNJI, OJ. and KASSIM, L.Q., 2009. Screening of *Abelmoschus esculentus* L. *Moench* for tolerance to spent engine oil. *Journal of Applied Biosciences*, vol. 20, p. 1131 – 1137.
- AGAMUTHU, P., ABIOYE, OP. and ABDUL AZIZ, A., 2010. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 179, p. 891–894.
- ALKIO, M., TABUCHI, TM., WANG, X. and COLÓN-CARMONA, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, no. 421, p. 2983-2994.

- ALVARENGA, RC., DA COSTA, LM., MOURA FILHO, W. and REGAZZI, AJ., 1995. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 30, no. 2, p. 175-185.
- AMAKIRI, JO. and ONOFEGHARA, FA., 1984. Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, vol. 35, no. 2, p. 159-167.
- BAKER, JM., 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution*, vol. 1, p. 27-44.
- BALLIANA, AG., MOURA. BB., PADIAL, AA., INCKOT, RC. and BONA, C. Avaliação morfofisiológica de mudas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel. *Rodriguésia*, dados não publicados.
- BANKS, MK. and SCHULTZ, KE., 2005. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water, air, and soil pollution*, vol. 167, no.1-4, p. 211-219.
- BONA, C., DA SILVA, MYB., REZENDE, IG., SANTOS, GO., SOUZA, LA. and INCKOT, RC., 2011a. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, vol. 25, no. 2, p. 277-285.
- BONA, C., REZENDE, IM., SANTOS, GO and SOUZA, LA., 2011 b. Effect of Soil Contaminated by Diesel Oil on the Germination of Seeds and the Growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Seedlings. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol.54 no.6, p. 1379-1387.
- CHEN, L., LIU, X., ZHANG, X., LIU, S., WEI, J. and XU, G., 2013. Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. *Plant and soil*, vol. 368, p. 355-363.
- CUNNINGHAM, SD. and OW, DW., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*, vol. 110, p. 715-719.

DE ALMEIDA, EL., MARCOS, FCC., SCHIAVINATO, MA., LAGÔA, AMMA. and DE ABREU, MF., 2008. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia*, vol. 67, no. 3, p. 569-576.

ENELL, A., FUHRMAN, F., LUNDIN, L., WARFVINGE, P. and THELIN, G., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in ash: Determination of total and leachable concentrations. *Environmental Pollution*, vol. 152, p. 285-292.

ENGEL, VL. and POGGIANI, F., 1991. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 3, no. 1, p. 39-45.

ESPINDULA, JAA., GUERRA, JGM. and ALMEIDA, DL., 2005. Uso de leguminosas herbáceas para adubação verde. 1ed. In: AQUINO, AM and ASSIS, RI. *Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 435-451.

GERHARDT, KE., HUANG, XD., GLICK, BR. and GREENBERG, BM., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, vol. 176, p. 20–30.

GOGOSZ, AM., BONA, C., SANTOS, GO. and BOTOSSO, PC., 2010. Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum contaminated soil and bioremediated soil. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 70, no. 4, 977-986.

INCKOT, RC., BONA, C., SOUZA, LA. and SANTOS, GO., 2008. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. *Rodriguesia*, vol. 59, no. 3, p. 513-524.

INCKOT, RC., SANTOS, GO., SOUZA, LA. and BONA, C., 2011. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora*, vol. 206, p. 261–266.

JOHANSEN, DA., 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York, 523p.

- KARNOVSKY, MJ., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, vol. 27, p. 137A-138A.
- KRAUS, JE. and ARDUIN, M., 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Rio de Janeiro, 198p.
- LI, X., FENG, Y. and SAWATSKY, N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of biorremediated soils. *Plant and Soil*, vol. 192, p. 219-226.
- LICHTENTHALER, HK. and WELLBURU, AR., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, vol. 603, no. 591-592.
- LIN, Q. and MENDELSSOHN, I., 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecological Engineering*, vol. 10, p. 263-274.
- LOPES, OMN., 2000. Feijão-de-porco. Leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo. Altamira: Embrapa Comunicado Técnico 12, p. 1-4.
- MAGUIRE, JD., 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, vol. 2, p. 176-177.
- MALALLAH, G., AFIAL, M., KURIAN, M., GULSHAN, S. and DHAMI, MSI., 1998. Impact of oil pollution plants on some desert. *Environment International*, vol. 24, no. 8, p. 919-924.
- MARANHO, LT., GALVÃO, F., PREUSSLER, KH., DE MUÑIZ, GIB. and KUNIYOSHI, YS., 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. *Acta bot. bras*, vol. 20, no. 3, p. 615-624.
- MERKL, N., SCHULTZE-KRAFT, R. and INFANTE, C., 2005. Phytoremediation in the tropics influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution*, vol. 138, no. 1, p. 86-91.
- MURATOVA, A.Y., TURKOVSKAYA, O.V., HUBNER, T.E. and KUSCHK, P. 2003. Studies of the efficacy of Alfalfa and Reed in the phytoremediation of

hydrocarbon-polluted soil. *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 39, p. 681-688.

NOGUEIRA, L., INCKOT, RC., SANTOS, GO., SOUZA, LA. and BONA, C. 2011. Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguésia*, vol. 62, no. 3, p. 459-466.

ODJEGBA, VJ. and SADIQ, AO., 2002. Effects of spent engine oil on the growth parameters, chlorophyll and protein levels of *Amaranthus hybridus* L. *The Environmentalist*, vol. 22, p. 23–28.

PEARSE, AGE., 1961. *Histochemistry: theoretical and applied*. 2ed. London, 617p.

PEREIRA NETTO, AD., MOREIRA, JC., DIAS, AEXO., ARBILLA, G., FERREIRA, LFV., OLIVEIRA, AS. and BAREK, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. *Química Nova*, vol. 23, no. 6, p. 765-773.

PIRES, FR., De SOUZA, CM., Da SILVA, AA., De OLIVEIRA, SP., CECON, PR., Dos SANTOS, JB. and Dos SANTOS, EA., 2003. Seleção de plantas tolerantes ao tebuthiuron e com potencial para fitorremediação. *Revista Ceres*, vol. 50, no. 291, p. 583-594.

RENTZ, JA., CHAPMAN, B., ALVAREZ, PJJ. and SCHNOOR, JL., 2003. Stimulation of Hybrid Poplar Growth in Petroleum Contaminated Soils through Oxygen Addition and Soil Nutrient Amendments. *International Journal of Phytoremediation*, vol. 5, no. 1, p. 57-72.

ROMEIRO, S., LAGÔA, AMMA., FURLANI, PR., ABREU, CD. and PEREIRA, BFF., 2007. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* (L.) DC. *Bragantia*, vol. 66, no. 2, p. 327-334.

SANT'ANNA-SANTOS, BF., AZEVEDO, AA., ALVES, TG., CAMPOS, NV., OLIVA, MA. and VALENTE, VMM., 2014. Effects of emissions from an aluminium smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 225, p. 1-16.

- SASS, JE., 1951. Botanical Microtechnique. 2ed, Iowa State College Press, Iwoa, 228p.
- SILVA, MLC., COSTA, RS., SANTANA, AS. and KOBLITZ, MGB., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias, vol. 31, no. 3, p. 669-682.
- SCHWAB, P., BANKS, MK. and KYLE, WA., 2006. Heritability of phytoremediation potential for the alfalfa cultivar riley in petroleum contaminated soil paul. Water, Air, and Soil Pollution, vol. 177, p. 239–249.
- SMITH, MJ., FLOWERS, TH., DUNCAN, HJ. and ALDER, J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. Environmental Pollution, vol. 141, p. 519-525.
- SINGH, OV. and JAIN, RK., 2003. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. Appl Microbiol Biotechnol, vol. 63, p.128–135.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E., 2004. Fisiologia vegetal. 3ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Características do substrato e propriedades físico-químicas do óleo diesel utilizado no experimento.

Características do substrato		Propriedades do óleo diesel (S500)	
Ph	5,2	Composição:	
Alumínio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,0	Hidrocarbonetos aromáticos	
Cálcio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	6,7	Hidrocarbonetos parafínicos	
Magnésio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	3,7	Hidrocarbonetos naftênicos	
Potássio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,99	Enxofre	máx 500 mg/kg
Fósforo ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	34,10	Densidade	0,815 – 0,865 kg/m^3 a 20°C
Carbono (g dm^{-3})	50,3	Viscosidade	2,0-5,0 Cst a 40 °C
		T° de decomposição	400°C
		Condutividade elétrica	25 pS/m (mín.)

Tabela 2. Mensurações (μm) da raiz de *Canavalia ensiformis* após 30 (T30) e 90 (T90) dias de semeadura, em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com de óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). (n=3)

			SNC	SC6	SC12	SC25	f	p
Diâmetro da raiz	Distensão	T30	801,7 ^a ±47,9	1037 ^b ±140	1115 ^b ±114,6	1171 ^b ±20,8	8,93	0,006
		T90	806,1 ^a ±187	871,5 ^{ab} ±71,8	1217,3 ^b ±133,4	984,9 ^{ab} ±154,2	4,63	0,03
	Base	T30	1695,6±652	2280±52,7	2522±147,8	2248±210	2,99	0,09
		T90	-	1106,6±243	871,5±157,1	1106,6±20,8	0,31	0,74
Espessura córtex raiz	Distensão	T30	332,8±51	373±8,3	419±191,5	400±10,7	0,63	0,61
		T90	271,1 ^a ±50	304,3 ^a ±34,5	462 ^b ±50	354,1 ^{ab} ±77,1	6,86	0,01
	Base	T30	434,9 ^a ±118	662 ^b ±30,7	716 ^b ±15,49	610 ^b ±10,7	11,68	0,002
		T90	-	403,9±4,7	218,5±83,1	276,6±23,9	1,01	0,41
Diâmetro cilindro vascular raiz	Distensão	T30	263,9±4,7	282±0,1	285±33,2	283±19,3	0,95	0,45
		T90	221,3±37,4	243,4±9,5	318,1±23,9	260±64,4	3,31	0,07
	Base	T30	774,3±187	986,5±83,3	1174±69,9	972±91,8	2,7	0,11
		T90	830±0,1	586,5±220,5	636,3±62,8	594,8±86,3	2,6	0,12

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes baseados pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Mensurações (μm) do eofilo e metafile de *Canavalia ensiformis* após 30 (T30) e 90 (T90) dias de semeadura, em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com de óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). (n=3)

		SNC	SC6	SC12	SC25	f	p
Espessura limbo Eofilo	T30	202,4±19	195,3±22,6	198±1,9	211±23,5	0,44	0,72
	T90	301,5 ^a ±12,6	249 ^b ±0,1	240,7 ^b ±24,9	235,1 ^b ±4,7	13,8	0,001
Espessura par. Paliçádico Eofilo	T30	119,5±37,6	87,4±10,7	81,8±1,9	98,4±18,3	1,77	0,23
	T90	149,4 ^a ±21,9	102,3 ^b ±17,2	96,8 ^b ±4,7	77,4 ^b ±4,7	13,51	0,001
Espessura par. Esponjoso Eofilo	T30	73,5±5,7	68,8±9,7	80,2±4,7	74,4±10	0,58	0,64
	T90	113,4±20,8	102±4,7	88,5±9,5	113,3±4,7	2,91	0,1
Espessura limbo Metafile	T90	273,9 ^a ±24,9	251,7 ^{ab} ±19,1	226,8 ^b ±4,7	207,5 ^b ±16,6	7,82	0,009
Espessura par. Paliçádico Metafile	T90	118,9 ^a ±9,5	99,6 ^{ab} ±14,3	99,6 ^{ab} ±0,1	77,4 ^b ±11,3	8,84	0,006
Espessura par. Esponjoso Metafile	T90	102,3±17,2	108,2±17,1	77,4±4,7	85,7±4,7	3,84	0,056

Tabela 4. Teor de clorofila total e carotenóides no eofilo e metafile de *Canavalia ensiformis* aos 30 e 90 dias após a semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) com óleo diesel. (n=3)

Tratamento	Clorofila Total (µg/ml)			Carotenóides (µg/ml)		
	Eofilo	Eofilo	Metafile	Eofilo	Eofilo	Metafile
	T30	T90	T90	T30	T90	T90
SNC	3,15±3,09	6,14 ^a ±11,23	5,93±33,57	0,45±26,6	0,99±42,75	0,76±41,98
SC6	3,28±14,39	5,02 ^{ab} ±1	5,38±14,56	0,45±24,75	0,82±28,45	0,68±19,48
SC12	3,29±16,42	3,33 ^b ±27,34	3,36±25,08	0,46±22,68	0,51±29,8	0,43±35,04
SC25	3,49±38,44	3,74 ^{ab} ±23,87	3,08±26,69	0,55±30,71	0,63±34,76	0,37±21,53

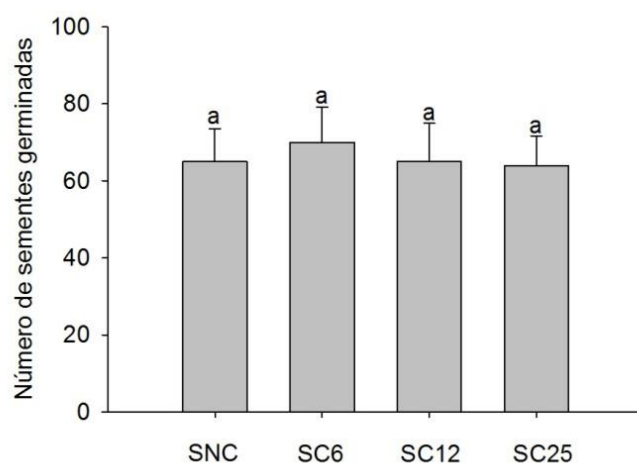


Figura 1. Avaliação do número de sementes germinadas em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Barras indicam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=75).



Figura 2. Plantas de *Canavalia ensiformis* após 30 e 60 dias da semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Barra: 4 cm.



Figura 3. Plantas de *Canavalia ensiformis* após 90 e 210 dias da semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). E. Detalhe do nódulo radicular. Barra: 4 cm.

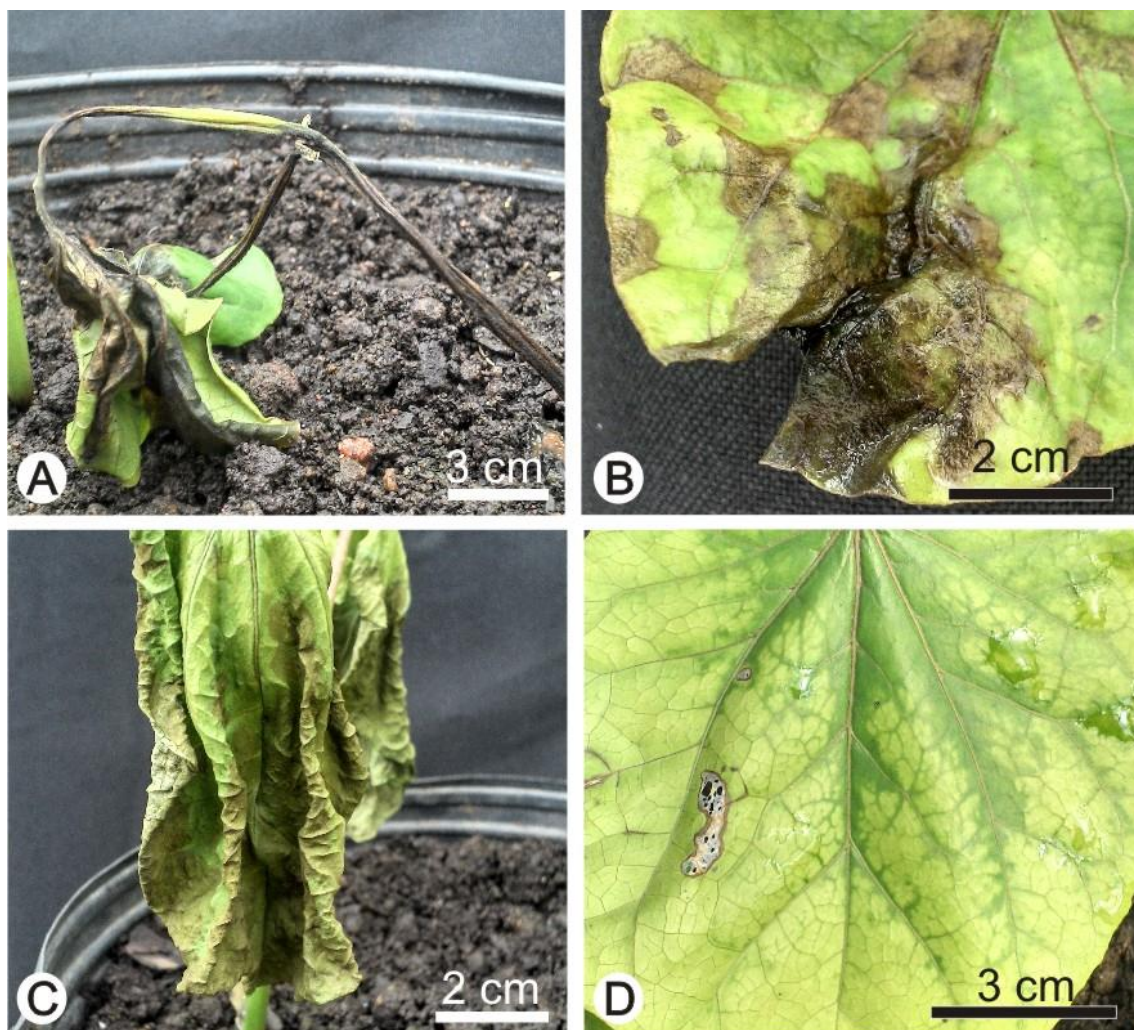


Figura 4. Sintomas em *Canavalia ensiformis* em substrato contaminado com óleo diesel após 30 dias da semeadura. A. Escurecimento do caule; B. Necrose do eófilo; C. Ressecamento do metafilo; D. Amarelecimento do eófilo.

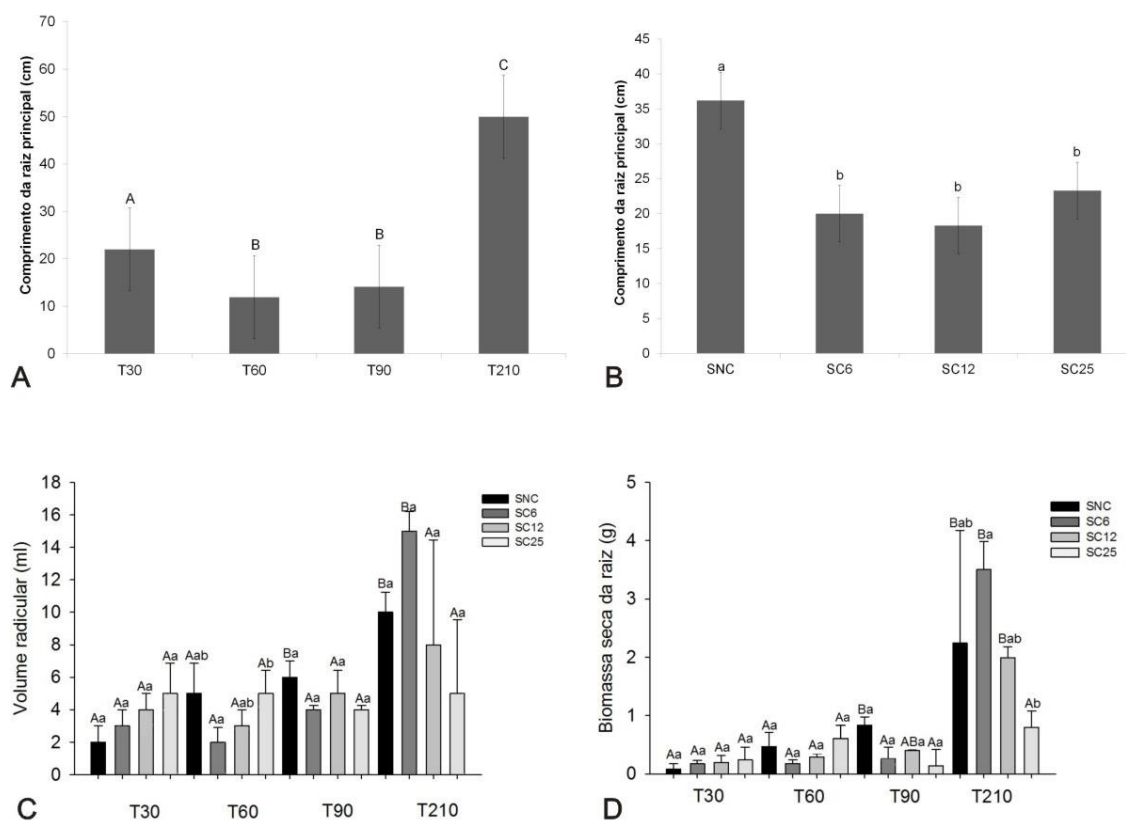


Figura 5. Avaliação do comprimento da raiz principal (A, B), volume radicular (C) e biomassa radicular (D) de *Canavalia ensiformis* após 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 210 (T210) dias de plantio em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Letras maiúsculas são referentes ao tempo e minúsculas aos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

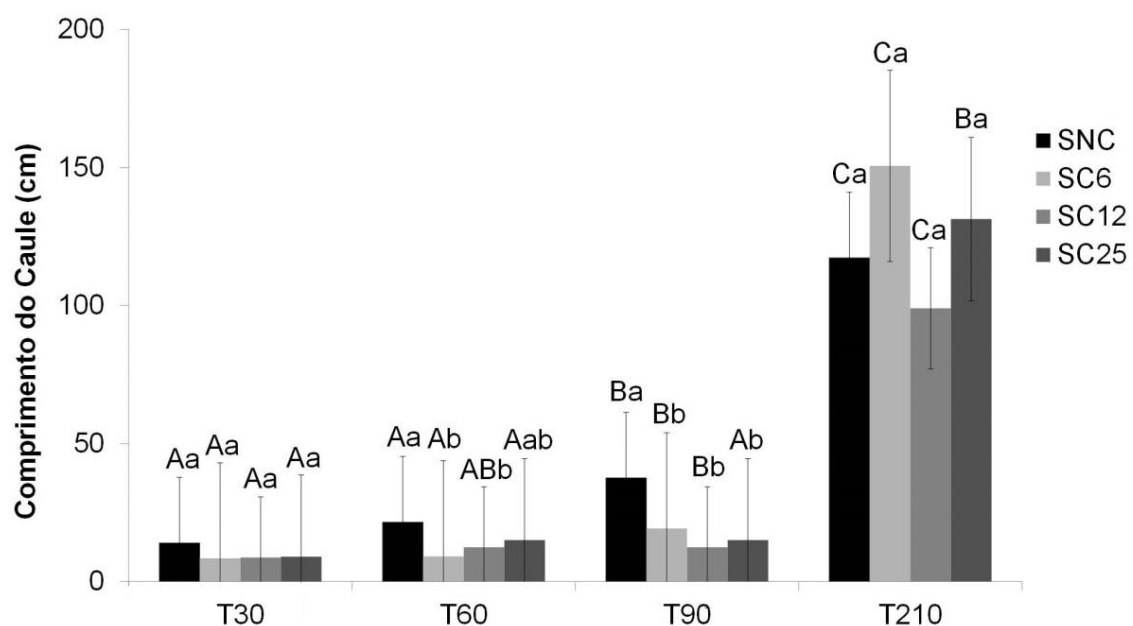


Figura 6. Avaliação do comprimento do caule de *Canavalia ensiformis* após 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 210 (T210) dias em experimento com substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Letras maiúsculas são referentes ao tempo e minúsculas aos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n=3$).

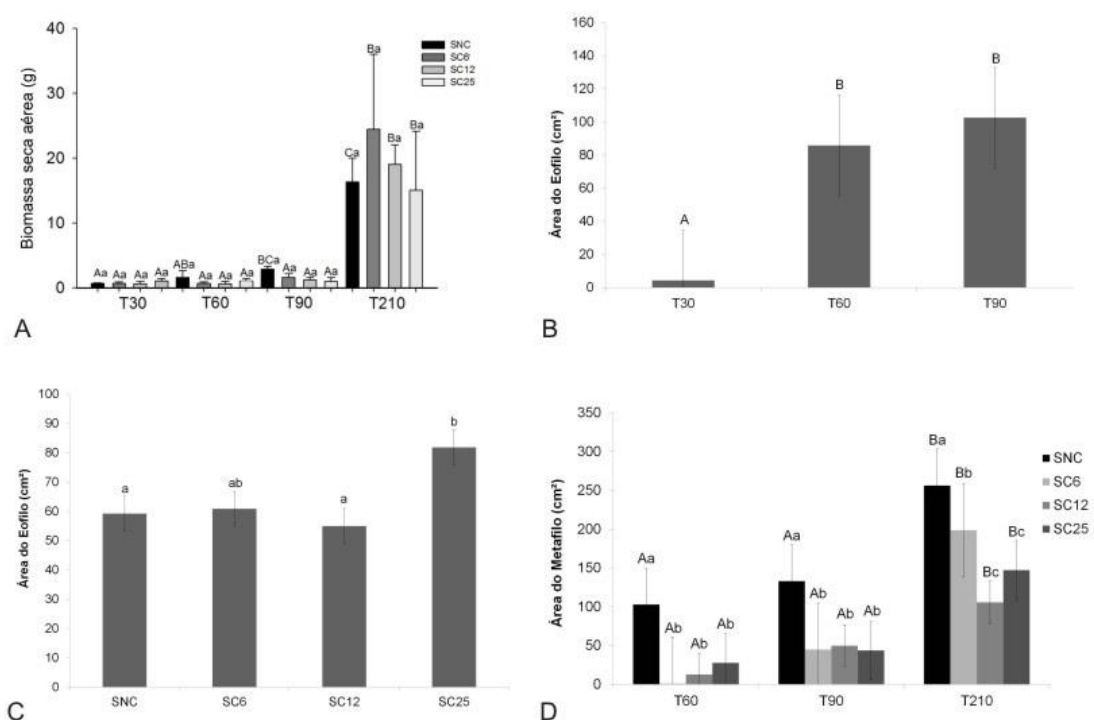


Figura 7. Avaliação de *Canavalia ensiformis* após 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 210 (T210) dias em experimento com substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). A. Biomassa aérea; B, C. Área foliar do eofilo; D. Área foliar do metafilo. Letras maiúsculas são referentes ao tempo e minúsculas aos tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

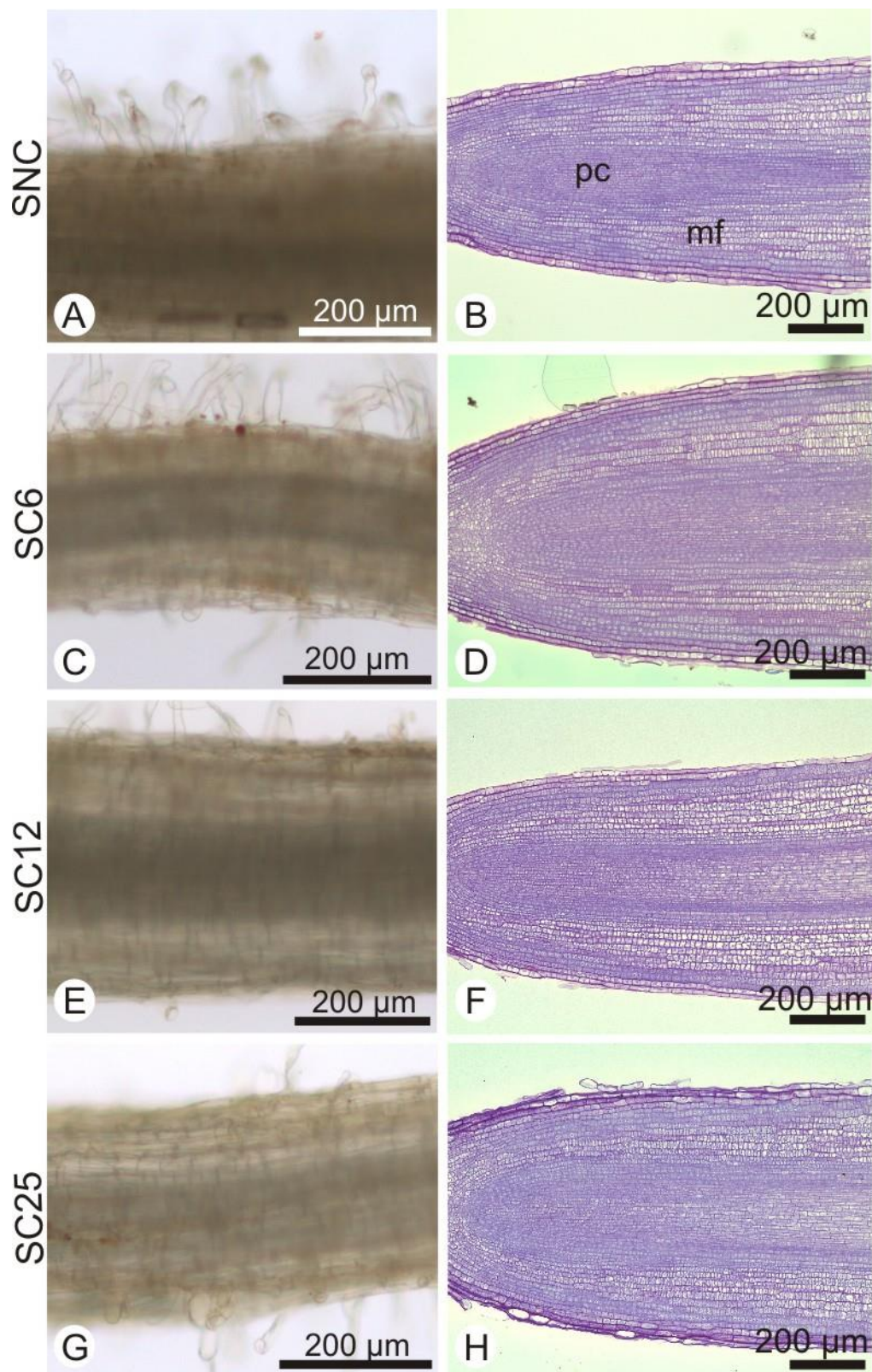


Figura 8. Raiz de *Canavalia ensiformis*, após 90 dias, em substrato não contaminado (SNC) e substrato contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). A, C, E, G. Vista frontal de raízes terciárias com tricomas radiculares. B, D, F, H. Secção longitudinal do meristema apical da raiz; meristema fundamental (mf) e procâmbio (pc).

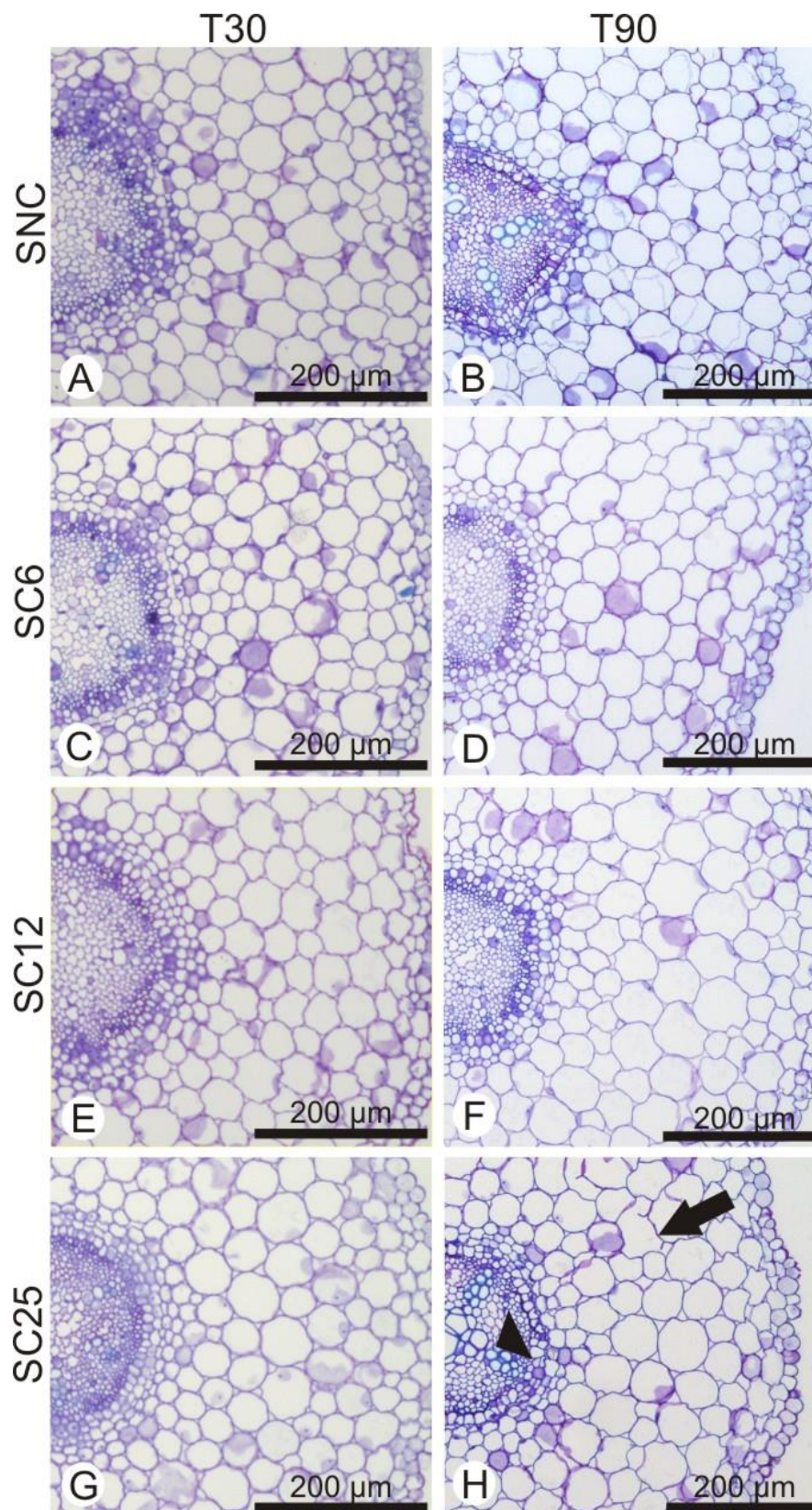


Figura 9. Secções transversais de raízes secundárias de *Canavalia ensiformis* após 30 dias (T30) e 90 dias (T90) da semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Notar metaxilema diferenciado (cabeça de seta) e células corticais rompidas (seta) em H.

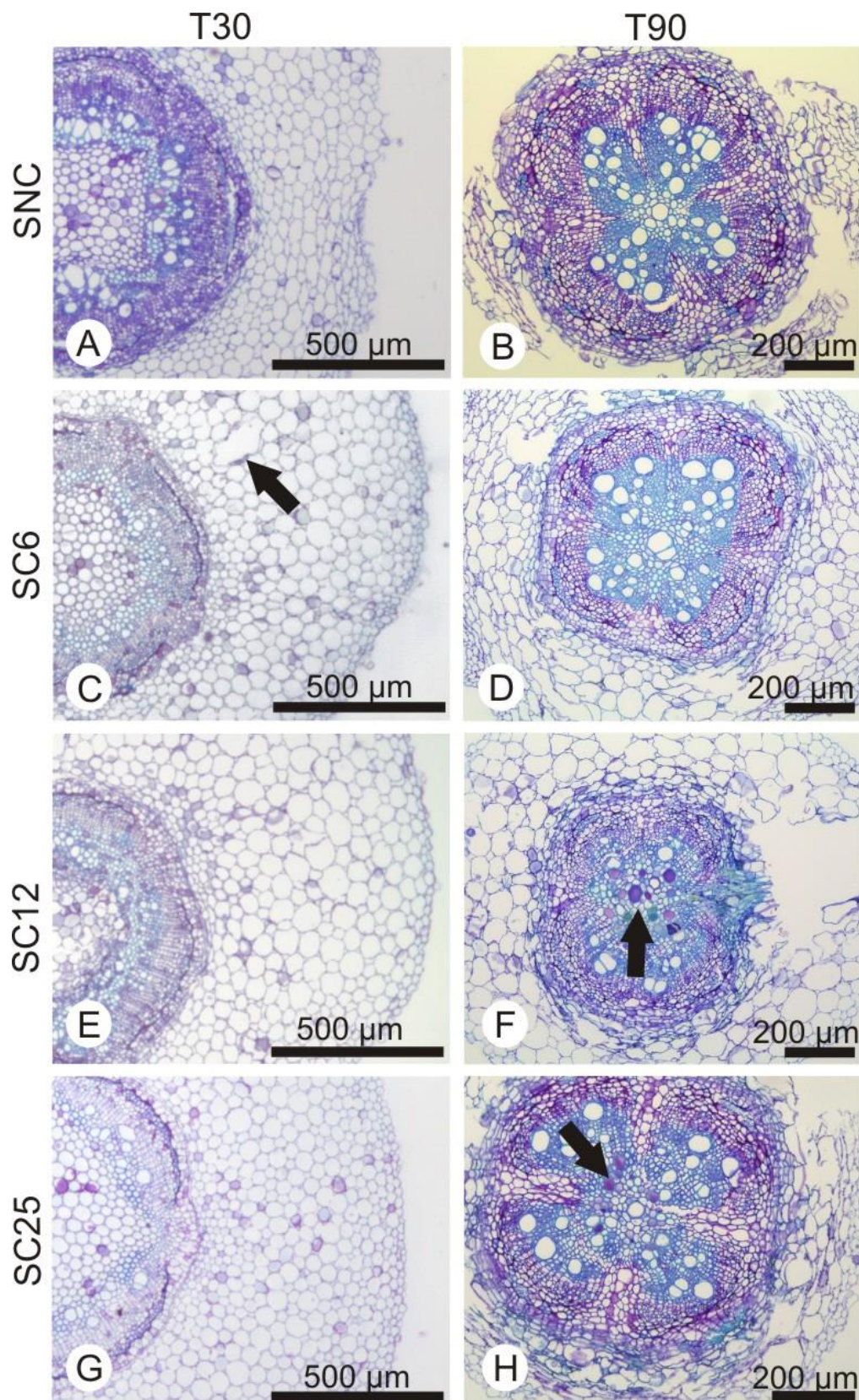


Figura 10. Secções transversais de raízes secundárias de *Canavalia ensiformis* após 30 dias (T30) e 90 dias (T90) da semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25). Notar células corticais rompidas (seta) em B e vasos obliterados em G e H (seta).

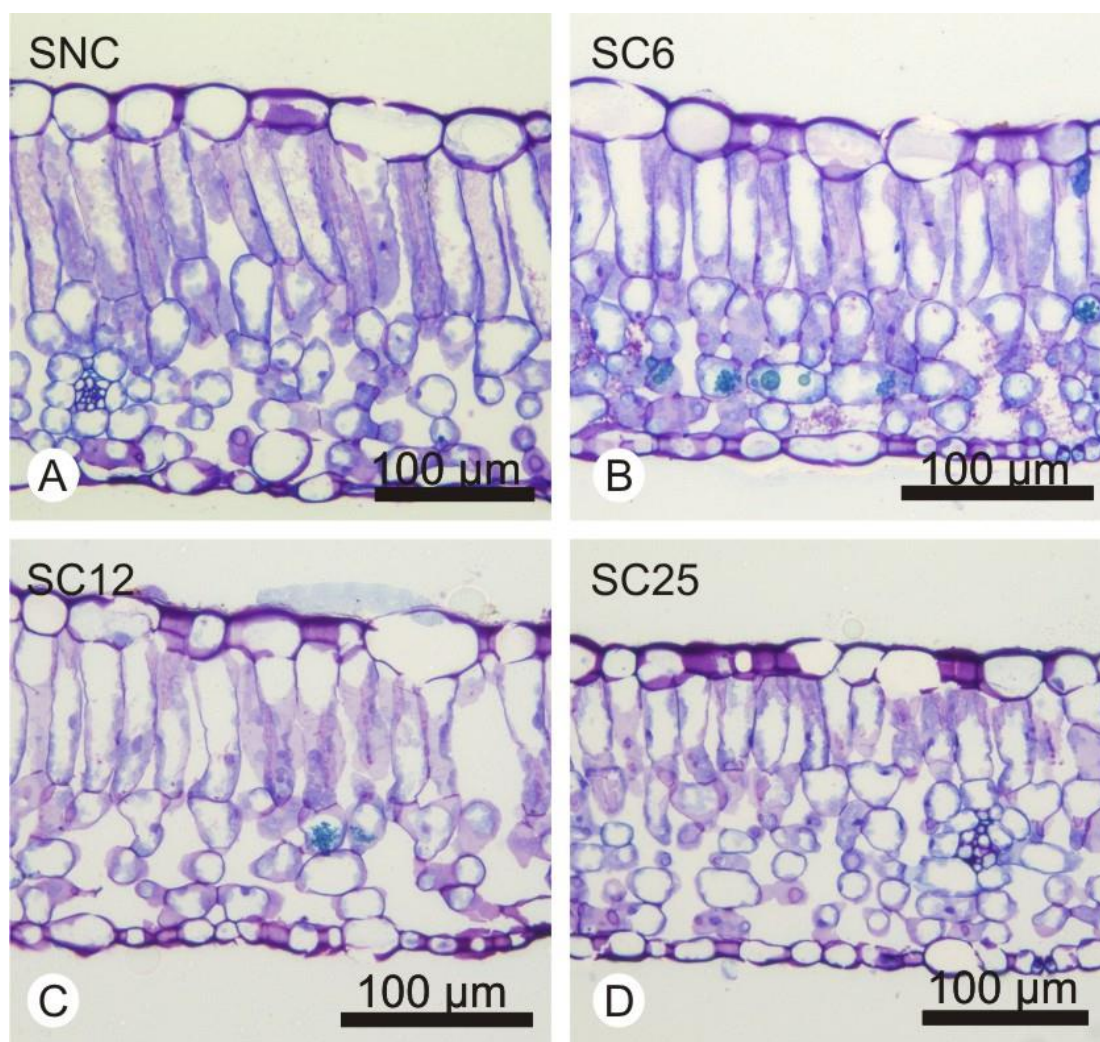


Figura 11. Secções transversais do eófilo de *Canavalia ensiformis* aos 90 dias após a semeadura em substrato não contaminado e contaminado com 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) com óleo diesel.

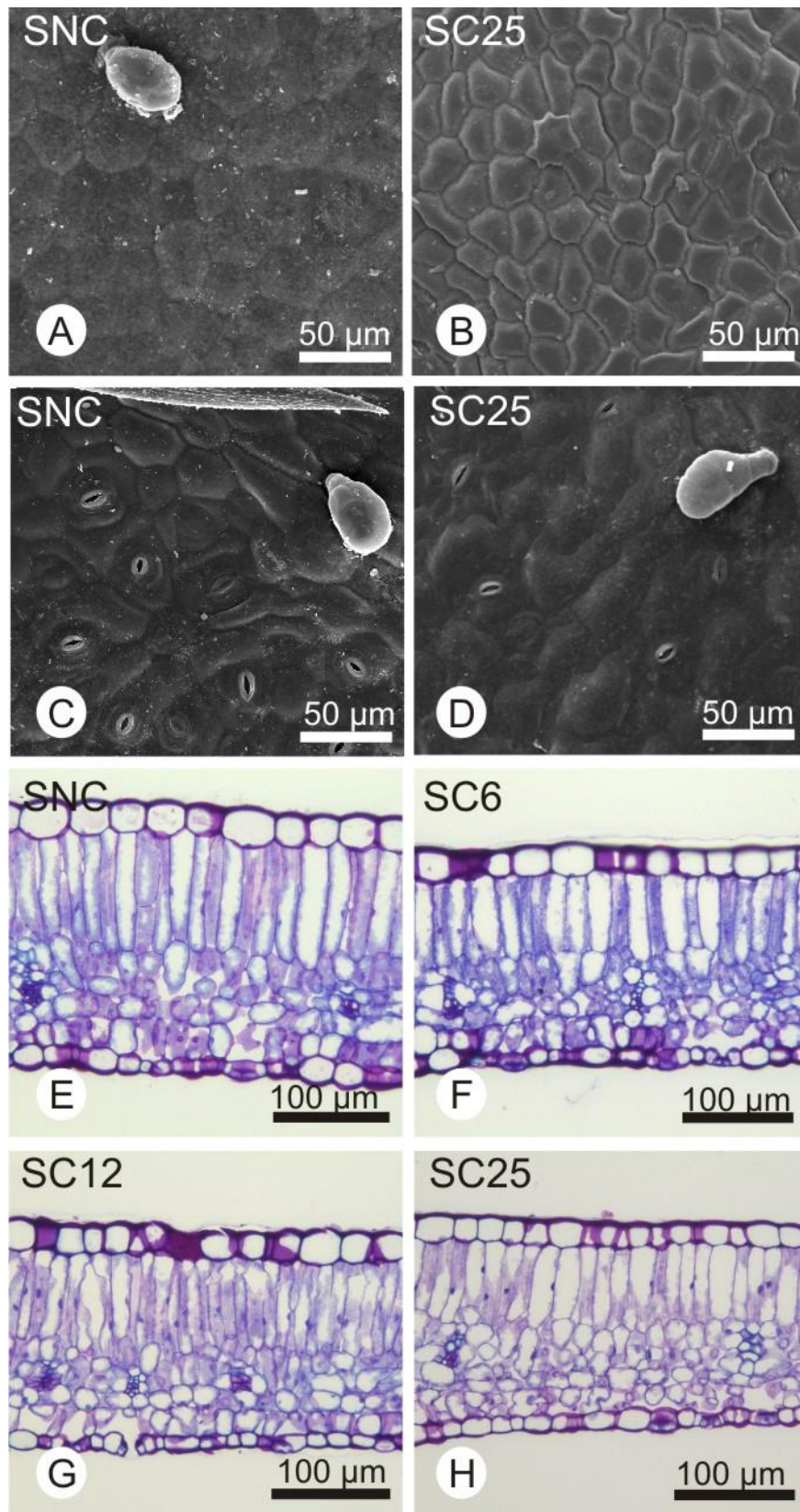


Figura 12. Vista frontal (A-D) e seções transversais (E-H) do metafilo de *Canavalia ensiformis* aos 90 dias após a semeadura em substrato não contaminado e contaminado com 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) com óleo diesel. Superfície adaxial (A, B) e abaxial (C, D) em microscopia eletrônica de varredura.

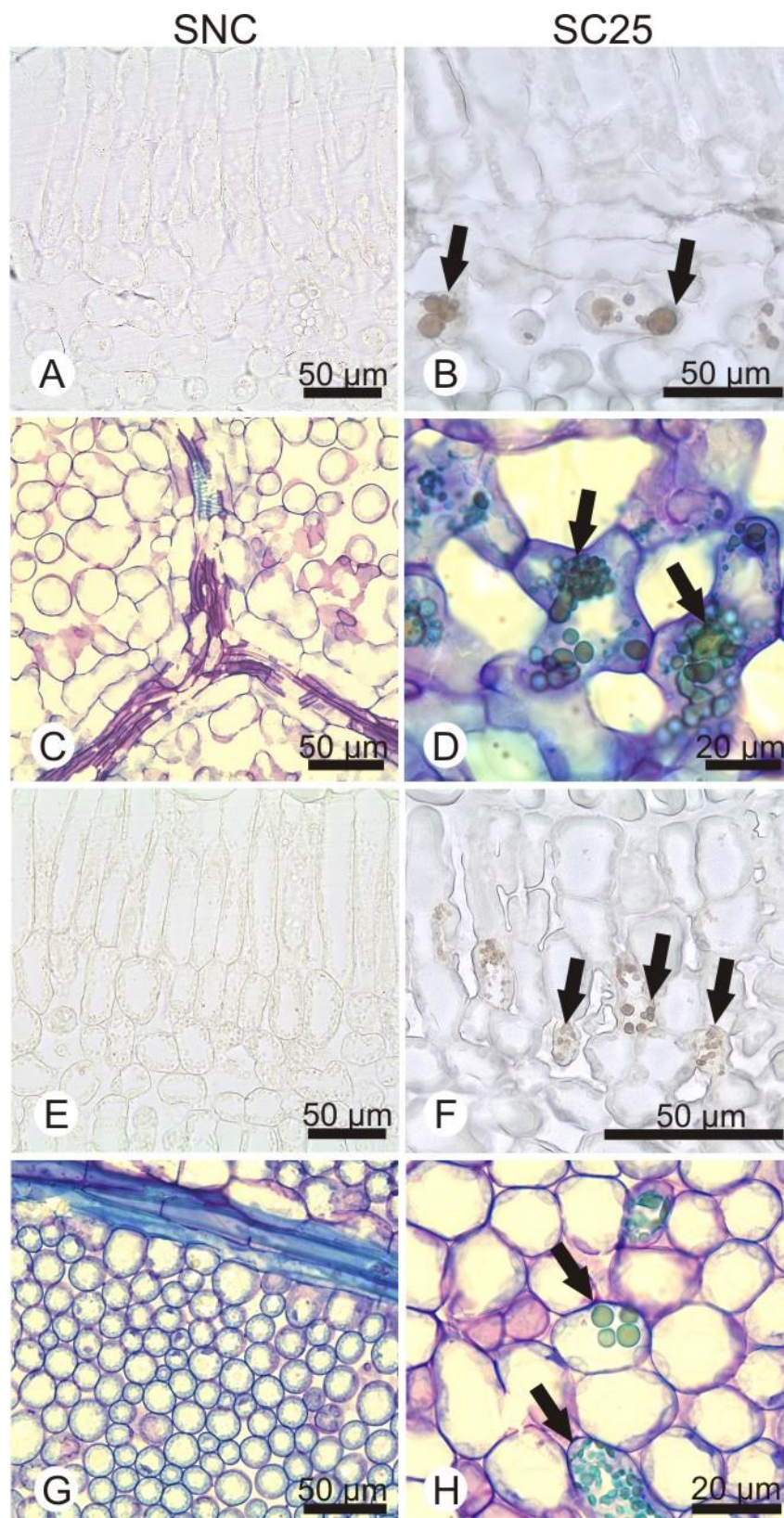


Figura 13. Secções transversais (A, B, E, F) e corte paradérmico (C, D, G, H) do eófilo (A-D) e metafilo (E-H) de *Canavalia ensiformis* aos 90 dias após a sementeira em substrato não contaminado (SNC) e contaminado a 25% (SC25) com óleo diesel. Setas indicam compostos fenólicos. A, B, E, F. Teste com cloreto férrico; C, D, G, H. Azul de toluidina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Canavalia ensiformis (L.) DC. não tem o crescimento afetado quando em substrato contaminado com concentrações de até 47,5 ml diesel kg⁻¹. A boa germinação e bons resultados de crescimento e anatômicos conferem a espécie bons indícios para ser utilizada no processo de fitorremediação. Quando aumentado o nível de toxicidade do óleo diesel (95 ml diesel kg⁻¹ de substrato), o sistema radicular foi drasticamente afetado, porém, as plantas que sobreviveram formaram novas raízes adaptadas ao ambiente contaminado, garantindo o crescimento e desenvolvimento da planta.

APÊNDICE

AI. Dados de crescimento de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado (SC) com óleo diesel após 30 dias de experimento.

	SNC	SC
Comprimento da Raiz (cm)	43	13
	20	32
	38	19
	63	22
	51	35
Volume da Raiz (ml)	15	4
	15	5
	15	3
	19	3
	15	5
Biomassa Raiz (g)	0,76	0,15
	1,54	0,23
	1,14	0,34
	2,22	0,34
	1,57	0,23
Área do metafilo (cm ²)	66,8	42
	75,6	15
	48,4	31,3
	65,3	30,2
	60,2	26,1
Biomassa aérea(g)	5,7	1,2
	12,9	2
	9,9	2,5
	11,9	2,3
	7,3	1

AII. Teores de clorofila total e carotenóides no metafilo de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado (SC) com óleo diesel após 30 dias de experimento.

Tratamento	Clorofila Total (µg/ml)	Carotenóides (µg/ml)
SNC	3,14	0,37
	3,17	0,52
	2,94	0,41
	3,53	0,56
	4,13	0,74
SC	1,89	0,17
	2,36	0,31
	2,42	0,41
	2,50	0,35
	1,75	0,11

AIII. Comprimento do caule de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado (SC) com óleo diesel durante quatro semanas de experimento.

Semana 1				Semana 2				Semana 3				Semana 4			
SNC		SC		SNC		SC		SNC		SC		SNC		SC	
SNC1	10	SC1	9	SNC1	27,5	SC1	14,5	SNC1	29	SC1	15	SNC1	61	SC1	15
SNC2	11	SC2	9	SNC2	19,5	SC2	20	SNC2	25	SC2	20	SNC2	34	SC2	20
SNC3	12	SC3	9	SNC3	29,5	SC3	13	SNC3	29,5	SC3	15	SNC3	29,5	SC3	16
SNC4	12	SC4	11	SNC4	79	SC4	14	SNC4	86	SC4	14	SNC4	126	SC4	14
SNC5	11	SC5	13	SNC5	18	SC5	13,5	SNC5	23	SC5	14	SNC5	27	SC5	14
SNC6	13,5	SC6	12,5	SNC6	28	SC6	12	SNC6	37	SC6	12	SNC6	59	SC6	12
SNC7	10	SC7	9	SNC7	29,5	SC7	19	SNC7	41	SC7	19	SNC7	60	SC7	19
SNC8	11	SC8	12	SNC8	33	SC8	9	SNC8	49	SC8	9	SNC8	65	SC8	9
SNC9	9	SC9	12	SNC9	30	SC9	13	SNC9	37	SC9	13	SNC9	44,5	SC9	13
SNC10	9	SC10	14,5	SNC10	46	SC10	8,5	SNC10	78	SC10	10	SNC10	93	SC10	14
SNC11	10	SC11	9,5	SNC11	44	SC11	13	SNC11	75	SC11	13	SNC11	89	SC11	13
SNC12	11	SC12	9	SNC12	40	SC12	9	SNC12	51	SC12	9	SNC12	88	SC12	9
SNC13	15	SC13	15	SNC13	43,5	SC13	12	SNC13	52	SC13	12	SNC13	89	SC13	12
SNC14	12	SC14	12	SNC14	42	SC14	16	SNC14	53	SC14	17	SNC14	83	SC14	19
SNC15	10	SC15	11	SNC15	36	SC15	8	SNC15	40	SC15	10	SNC15	68	SC15	11
SNC16	8	SC16	11	SNC16	17	SC16	12	SNC16	25	SC16	12	SNC16	35	SC16	12
SNC17	12	SC17	13	SNC17	22,5	SC17	8,5	SNC17	29	SC17	9	SNC17	45,5	SC17	9
SNC18	11	SC18	12	SNC18	16,5	SC18	9	SNC18	19	SC18	11	SNC18	25	SC18	11
SNC19	11	SC19	10	SNC19	16	SC19	11,5	SNC19	28	SC19	11,5	SNC19	37,5	SC19	13
SNC20	13	SC20	9	SNC20	20,5	SC20	11	SNC20	26,5	SC20	11	SNC20	39	SC20	11
SNC21	12	SC21	9	SNC21	20	SC21	10,5	SNC21	25	SC21	11	SNC21	31	SC21	11
SNC22	11,5	SC22	12	SNC22	22	SC22	10,5	SNC22	31	SC22	11	SNC22	39	SC22	11
SNC23	11	SC23	9	SNC23	22	SC23	20,5	SNC23	30	SC23	21	SNC23	47	SC23	23,5
SNC24	15	SC24	8	SNC24	20	SC24	11	SNC24	26	SC24	11	SNC24	33,5	SC24	11
SNC25	13	SC25	11	SNC25	20	SC25	10	SNC25	20	SC25	11	SNC25	21	SC25	11
SNC26	9,5	SC26	12	SNC26	39	SC26	11	SNC26	62	SC26	11	SNC26	78	SC26	11
SNC27	9	SC27	11	SNC27	92	SC27	7	SNC27	85	SC27	7	SNC27	103	SC27	8
SNC28	8	SC28	10	SNC28	27	SC28	13	SNC28	32	SC28	13	SNC28	50	SC28	13
SNC29	10	SC29	15	SNC29	20	SC29	15	SNC29	20	SC29	15	SNC29	22,5	SC29	15
SNC30	9	SC30	13	SNC30	20	SC30	15	SNC30	31	SC30	14	SNC30	47	SC30	14

AIV. Mensurações de raiz na região de distensão e basal de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado (SC) com óleo diesel após 30 dias de experimento.

Mensuração da raiz (µm)	SNC		SC	
	Distensão	Base	Distensão	Base
Diâmetro da Raiz	893,6	-	921,3	-
	942	-	799	-
	675	-	145,1	-
Espessura do Córtex	352,3	-	330,6	-
	355,5	-	307,1	-
	243,4	-	592	-
Diâmetro Cilindro Vascular	200,5	828,6	265,6	481,4
	242	1184,1	186,7	204,7
	182,6	608,6	356	403

AV. Mensurações do eofilo e metafile de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado (SC) com óleo diesel após 30 dias de experimento.

	Mensuração do Eofilo (µm)		Mensuração do Metafile (µm)	
	SNC	SC	SNC	SC
Espessura do limbo	244,8	279,4	203,3	170,1
	293,2	199,2	224,1	154,9
	312,6	231	289,1	170,1
Espessura Par. Paliádico	117,5	132,8	121,7	83,6
	159	89,3	112	78,1
	177	107,9	113,4	81,9
Espessura Par. Esponjoso	91,4	108,2	66,4	55,3
	98,2	61	83,3	42,8
	95,4	73,6	132,8	49,8

AVI. Dados de crescimento de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 210 (T210) dias de experimento.

		T30	T60	T90	T210
Comprimento da raiz principal (cm)	SNC	33	6,5	7,5	67
		26	38	55	61
		30	30	21	60
	SC6	21	5	4	40
		25,5	7	7,5	50
		20	2,5	23	35
	SC12	16	3	3,5	50
		21	11	17,5	32
		21	2,5	3,5	40
	SC25	25	11	9	45
		10	12	3	60
		16	14,5	15	60
Volume da raiz (ml)	SNC	2	2	6	5
		1	6	6	8

(continuação)

		T30	T60	T90	T210
		3	4	10	15
	SC6	3	1	2	10
		4	2	5	15
		2	1	6	15
	SC12	2	2	6	10
		5	4	6	10
		3	3	4	5
	SC25	8	5	7	5
		3	7	2	10
		3	6	4	5
Biomassa seca da raiz (g)	SNC	0,06	0,21	0,74	2,24
		0,08	0,71	0,83	1,20
		0,20	0,47	0,99	4,32
	SC6	0,19	0,24	0,07	3,89
		0,25	0,18	0,39	3,50
		0,16	0,12	0,56	2,65
	SC12	0,15	0,17	0,41	2,00
		0,34	0,29	0,40	1,99
		0,21	0,32	0,38	1,23
	SC25	0,24	0,48	0,45	0,80
		0,49	0,44	0,14	1,00
		0,21	0,74	0,26	0,20
Biomassa seca aérea (g)	SNC	0,59	1,84	4,80	19,31
		0,75	3,12	4,91	9,74
		0,64	2,84	5,44	16,29
	SC6	0,68	1,66	1,60	17,33
		0,93	1,00	1,53	24,40
		0,63	0,89	2,70	36,83
	SC12	0,53	0,66	1,43	19,00
		1,01	1,20	1,45	20,30
		0,61	1,55	1,85	10,00
	SC25	1,42	2,06	1,58	15,00
		1,01	0,66	1,00	24,00
		0,59	1,61	0,82	5,00
Comprimento do caule (cm)	SNC	20	17,5	40	120
		18	24	34	130
		20	23,5	39	102
	SC6	17	10	15,5	194
		15	9	16	131
		15,5	8,5	26,5	127
	SC12	18	11,2	27	125
		15	13	18	92
		16	13	19	80
	SC25	18	14	16,5	104
		17	15	14	190
		18,4	16	13	100

AVII. Área do eofilo (cm²) de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias de experimento.

	T30	T60	T90
SNC	3.797	54.152	106.299
	3.818	56.705	79.590
	3.749	89.035	106.929
	3.708	82.945	101.1
	3.807	36.645	122.5
	3.421	74.310	134.662
SC6	3.528	109.630	71.2
	3.268	109.071	72.116
	5.372	90.743	77.017
	5.949	90.743	79.146
	4.271	63.701	111.823
	4.186	67.380	107.767
SC12	2.792	66.224	80.561
	2.998	54.2	91.508
	5.048	79.561	89.314
	4.402	79.363	81.844
	4.130	87.365	80.561
	3.210	86.378	91.508
SC25	3.522	135.629	53.921
	3.490	125.956	35.819
	7.807	98.2	53.921
	8.055	122.2	35.819
	5.810	104.119	53.921
	5.120	94.280	55

AVIII. Área do metafile (cm²) de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 60 (T60), 90 (T90) e T210 (T210) dias de experimento.

	T60	T90	T210
SNC	82.194	104.699	270.3
	92.206	62.575	265.1
	134.648	142.236	233.6
SC6	0	3.123	207
	0	44.176	200.2
	1.121	57.556	189.3
SC12	9.479	58.035	109.2
	0.847	50.230	105.3
	28.070	41.2	102.9
SC25	28.055	52	148.7
	33.719	43	150.2
	21.453	35.819	143.2

AIX. Teor de clorofila total e carotenóides no eofilo e metafile de *Canavalia ensiformis* aos 30 (T30) e 90 (T90) dias após a semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25).

Tratamento	Clorofila Total (µg/ml)			Carotenóides (µg/ml)		
	Eofilo	Eofilo	Metafile	Eofilo	Eofilo	Metafile
	T30	T90	T90	T30	T90	T90
SNC	3,94	6,33	6,47	0,63	0,89	0,86
	2,83	7,5	5,88	0,38	1,3	0,71
SC6	2,69	4,6	5,44	0,35	0,78	0,71
	3,28	4	8,5	0,41	0,59	1,34
	3,35	6,05	3,34	0,48	1,06	0,27
SC12	3,21	6	4,32	0,46	1	0,43
	3,19	3,1	5,05	0,46	0,49	0,86
	3,23	3,57	2,51	0,44	0,54	0,35
SC25	3,44	3	2,53	0,50	0,5	0,1
	4,45	2,8	2,62	0,73	0,34	0,26
	3,06	4,63	3,2	0,50	0,87	0,36
	2,97	3,79	3,44	0,42	0,7	0,49

AX. Mensurações de raiz na região de distensão e basal de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 30 dias de experimento.

		SNC	SNC	SNC			SNC	SNC	SNC
Z. Distensão	Diâmetro total	830	747	830	Base	Diâmetro total	2265.9	1826	981.89
	Diâmetro cilindro	265.6	257.3	265.6		Diâmetro cilindro	1112.2	865.69	345.28
	Espessura cortex	282.2	384.29	332		Espessura cortex	525.39	478.08	301.29
		SC6	SC6	SC6			SC6	SC6	SC6
Z. Distensão	Diâmetro total	1037.5	1280.69	1037.5	Base	Diâmetro total	2332.3	2226.89	2282.5
	Diâmetro cilindro	284.69	284.69	284.69		Diâmetro cilindro	898.89	1064.89	996
	Espessura cortex	365.2	381.8	373.5		Espessura cortex	691.39	630	664
		SC12	SC12	SC12			SC12	SC12	SC12
Z. Distensão	Diâmetro total	1037.5	1266.58	1162	Base	Diâmetro total	2392.89	2683.39	2490
	Diâmetro cilindro	253.98	320.38	284.69		Diâmetro cilindro	1299.78	1299.78	1178.6
	Espessura cortex	310.18	473.1	91.3		Espessura cortex	702.18	732.89	713.8
		SC25	SC25	SC25			SC25	SC25	SC25
Z. Distensão	Diâmetro total	11012.6	1120.5	1079	Base	Diâmetro total	2041.8	2461.78	2241
	Diâmetro cilindro	251.49	287.18	282.2		Diâmetro cilindro	871.5	1050.78	996
	Espessura cortex	386.78	406.7	390.1		Espessura cortex	602.58	622.5	605.9

AXI. Mensurações de raiz na região de distensão e basal de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 90 dias de experimento.

		SNC	SNC	SNC			SNC	SNC	SNC
Z. Distensão	Diâmetro total	996	622.5	830	Base	Diâmetro total			
	Diâmetro cilindro	257.3	182.6	224.1		Diâmetro cilindro	830	830	830
	Espessura cortex	323.7	224.1	265.6		Espessura cortex			
		SC6	SC6	SC6			SC6	SC6	SC6
Z. Distensão	Diâmetro total	913	788.5	913	Base	Diâmetro total	1286.5	830	1203.5
	Diâmetro cilindro	249	232.4	249		Diâmetro cilindro	722.1	332	705.5
	Espessura cortex	332	265.6	315.4		Espessura cortex	249	257.3	249
		SC12	SC12	SC12			SC12	SC12	SC12
Z. Distensão	Diâmetro total	1120.5	1369.5	1162	Base	Diâmetro total	1120.5	830	1079
	Diâmetro cilindro	290.5	332	332		Diâmetro cilindro	680.6	564.4	664
	Espessura cortex	415	514.6	456.5		Espessura cortex	282.2	124.5	249
		SC25	SC25	SC25			SC25	SC25	SC25
Z. Distensão	Diâmetro total	879.8	1162	913	Base	Diâmetro total	1079	1102.5	1120.5
	Diâmetro cilindro	207.5	332	240.7		Diâmetro cilindro	498	664	622.5
	Espessura cortex	290.5	439.9	332		Espessura cortex	290.5	249	290.5

AXII. Mensurações do eofilo de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 30 dias de experimento.

		SNC	SNC	SNC
EOFILO	Esp Total Limbo	182.6	204.18	220.78
	Esp Par Paliçadico	162.68	93.79	102
	Esp Par Esponjoso	67.2	77.19	77.19
		SC6	SC6	SC6
EOFILO	Esp Total Limbo	170.98	215.8	199
	Esp Par Paliçadico	79.68	99.6	83
	Esp Par Esponjoso	60.59	79.69	66.4
		SC12	SC12	SC12
EOFILO	Esp Total Limbo	195.88	199.2	199
	Esp Par Paliçadico	79.68	83	83
	Esp Par Esponjoso	74.7	83	74.7
		SC25	SC25	SC25
EOFILO	Esp Total Limbo	237.38	190.9	207.5
	Esp Par Paliçadico	116.2	79.68	99.6
	Esp Par Esponjoso	83	63	74.7

AXIII. Mensurações do eófilo e metafilo de *Canavalia ensiformis* em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25) após 90 dias de experimento.

		SNC	SNC	SNC			SNC	SNC	SNC
EOFILO	Esp Total Limbo	290.5	315.4	298.8	METAFILO	Esp Total Limbo	298.8	249	273.9
	Esp Par Paliçadico	124.5	166	157.7		Esp Par Paliçadico	124.5	107.9	124.5
	Esp Par Esponjoso	91.3	132.8	116.2		Esp Par Esponjoso	116.2	83	107.9
		SC6	SC6	SC6			SC6	SC6	SC6
EÓFILO	Esp Total Limbo	249	249	249	METAFILO	Esp Total Limbo	240.7	273.9	240.7
	Esp Par Paliçadico	116.2	83	107.9		Esp Par Paliçadico	83	107.9	107.9
	Esp Par Esponjoso	99.6	107.9	99.6		Esp Par Esponjoso	125.5	107.9	91.3
		SC12	SC12	SC12			SC12	SC12	SC12
EOFILO	Esp Total Limbo	265.6	215.8	240.7	METAFILO	Esp Total Limbo	224.1	224.1	232.4
	Esp Par Paliçadico	99.6	91.3	99.6		Esp Par Paliçadico	99.6	99.6	99.6
	Esp Par Esponjoso	99.6	83	83		Esp Par Esponjoso	74.7	74.7	83
		SC25	SC25	SC25			SC25	SC25	SC25
EÓFILO	Esp Total Limbo	232.4	240.7	232.4	METAFILO	Esp Total Limbo	190.9	224.1	207.5
	Esp Par Paliçadico	74.7	74.7	83		Esp Par Paliçadico	66.4	83	83
	Esp Par Esponjoso	116.2	116.2	107.9		Esp Par Esponjoso	83	91.3	83

AXIV. Mensurações da raiz de *Canavalia ensiformis* após 30 dias de semeadura em substrato não contaminado (SNC) e contaminado com de óleo diesel a 6% (SC6), 12% (SC12) e 25% (SC25).

		SNC	SNC	SNC			SNC	SNC	SNC
Z. Distensão	Diametro total	830	747	830	Base	Diametro total	2265.9	1826	981.89
	Diametro cilindro	265.6	257.3	265.6		Diametro cilindro	1112.2	865.69	345.28
	Espessura cortex	282.2	384.29	332		Espessura cortex	525.39	478.08	301.29
		SC6	SC6	SC6			SC6	SC6	SC6
Z. Distensão	Diametro total	1037.5	1280.69	1037.5	Base	Diametro total	2332.3	2226.89	2282.5
	Diametro cilindro	284.69	284.69	284.69		Diametro cilindro	898.89	1064.89	996
	Espessura cortex	365.2	381.8	373.5		Espessura cortex	691.39	630	664
		SC12	SC12	SC12			SC12	SC12	SC12
Z. Distensão	Diametro total	1037.5	1266.58	1162	Base	Diametro total	2392.89	2683.39	2490
	Diametro cilindro	253.98	320.38	284.69		Diametro cilindro	1299.78	1299.78	1178.6
	Espessura cortex	310.18	473.1	91.3		Espessura cortex	702.18	732.89	713.8
		SC25	SC25	SC25			SC25	SC25	SC25
Z. Distensão	Diametro total	11012.6	1120.5	1079	Base	Diametro total	2041.8	2461.78	2241
	Diametro cilindro	251.49	287.18	282.2		Diametro cilindro	871.5	1050.78	996
	Espessura cortex	386.78	406.7	390.1		Espessura cortex	602.58	622.5	605.9

